



**MICHELLE GUITTON COTTA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO  
GENE *CaLTP* EM *Coffea* spp**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**MICHELLE GUITTON COTTA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *CaLTP* EM  
*Coffea* spp**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pierre Roger René Marraccini

Coorientador

Dr. Leila Maria Gomes Barros

**LAVRAS-MG**

**2012**

**MICHELLE GUITTON COTTA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *CaLTP* EM  
*Coffea spp***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de Julho de 2012.

PhD. Hugo Bruno C. Molinari

EMBRAPA

PhD. Ana Cristina M. Brasileiro

EMBRAPA

Dr. Pierre Roger René Marraccini  
Orientador

Dra. Leila Maria Gomes Barros  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2012**

***Dedico***

A todos que me fizeram  
acreditar nesse sonho e que  
trabalharam muito para que eu  
pudesse realizá-lo.



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida e por sempre iluminar meu caminho.

A toda minha família, e em especial, aos meus pais e irmãos. Aos meus pais, meus exemplos de vida, agradeço pela paciência, compreensão, amor incondicional, carinho e apoio. Vocês são meus ídolos, meus heróis. Com vocês aprendi a acreditar nos meus sonhos e batalhar para alcançá-los. Aos meus irmãos, Dani e Lipe agradeço por uma vida repleta de alegrias, diversão, confusão, amizade e muita, muita cumplicidade.

As minhas amigas-irmãs de vida: Amanda Creuza, Bárbara, Bia, Eliana, Giselda, Laís, Lelê Borges, Luceffa, Lucinetty e Rê Paes, muito obrigada, sei que posso contar com vocês pra sempre!

Aos queridos amigos de coração e de lab: Eder e Naty, muito obrigada por todo o apoio nos experimentos e nos momentos difíceis, vocês são extraordinários, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil!

A Rê Santana, amiga de vida e colega de bancada, muito obrigada por todos os ensinamentos, questionamentos, conversas, auxílio e diversão durante todos esses anos!

A todos que trabalharam no LaB II e no LGM, e compartilharam o dia-a-dia deste trabalho: Daiene, Dênis, Cecília, Layane, Henrique, Hugo, Herdson, Janete, Aline, Fernanda, Tati, Jean, Rafa e Felipe. Muito obrigada por todo o auxílio e carinho, sempre.

Aos eternos amigos da UnB: D. Juan, Carol Brêttas, Dadai Viana, Dan, Cho, Lolo, Kchos, Ramon e Tatá. Aos amigos de Lavras: Mayara, Larissa, Samuel, Romário, Marcelo P., Kollien, Ana P, Camila, Leandra, Emanuelle, Anderson, Hollys, Marcelo Derramado, Fabrício, Kalynka, Heliete, João Ronaldo, Patrick, Wesley, vocês são o máximo, muito obrigada por todo o apoio, ensinamentos, torcida e momentos de diversão!

As amigas de República: Carol, Thaís, Aline, Marlúcia, Laura e Andréa, com vocês dividi uma casa, receitas, preocupações, alegrias e muita felicidade!

A Vânia, a Dona Isabel e Adaílton por todo o auxílio, sempre.

Ao Lucas, por ter acreditado nesse projeto comigo, me incentivado e apoiado. Muito obrigada por todos os anos de alegria, compreensão, carinho, amor, apoio e amizade.

A querida família Guerra por todo amor, apoio, incentivo e alegria.

A Patrícia, Elisa e Luciano pela torcida e boas energias.

A todos os meus professores da UFLA, em especial, aos professores Luciano e Chalfun pelas sugestões feitas ao trabalho e pela disponibilidade.

A banca examinadora, Dra(s) Ana Brasileiro e Érika Albuquerque, e ao Dr. Hugo Molinari pelas correções e preciosas sugestões.

A Dra Juliana Dantas, agradeço muito, pela confiança, disponibilidade, orientação em muitas etapas deste trabalho, apoio e amizade.

Ao Dr. e Prof. Alan pelos ensinamentos, por diminuir minha ignorância científica, pelas sugestões e por disponibilizar sempre que necessário seu tempo e estrutura laboratorial para realização deste trabalho.

A Dra. Leila Barros pela orientação, confiança, apoio e amizade. Muito obrigada pela dedicação incondicional, por ter me ensinado tanto sobre pesquisa e por estar ao meu lado acreditando no meu potencial e, por todo o tempo, nos resultados deste trabalho.

Ao meu querido orientador, Dr. Pierre Marraccini pela orientação brilhante, genialidade, absoluta dedicação, confiança, paciência, disponibilidade, compreensão, apoio, amizade e alegria.

Ao Gabriel, em especial, meu amor, companheiro e amigo. Muito obrigada por todo apoio, força, ajuda e dedicação quando eu pensei que não conseguiria, pelos ensinamentos de profissão e de vida, pelo carinho. Com você, concluir esse sonho foi muito mais alegre, leve e feliz.

“O importante é não parar de questionar” (Albert Einstein)

## RESUMO

As proteínas de transferência de lipídeos não-específicas (nsLTPs) são proteínas básicas caracterizadas por resíduos de cisteínas conservados, baixa massa molecular e alto conteúdo de  $\alpha$ -hélices. Tais proteínas foram originalmente definidas pela capacidade de transferir fosfolipídeos *in vitro*. As nsLTPs estão envolvidas nos mecanismos de proteção das plantas contra estresses bióticos causados por fungos, vírus e bactérias. Evidências evolutivas sugerem que essas proteínas surgiram muito cedo durante a evolução das plantas terrestres. Uma família multigênica confere a expressão dos genes *nsLTPs*, o que pode explicar o padrão de expressão diferencial de acordo com o tecido, estágio de desenvolvimento e condições fisiológicas. Esses genes são responsivos a estresses abióticos tais como déficit hídrico, baixas temperaturas, salinidade e exposições a metais pesados. Considerando a importância das nsLTPs no metabolismo das plantas, o presente estudo objetiva: (i) identificar os diferentes genes *nsLTPs* homoeólogos de café que correspondem aos subgenomas ancestrais de *Coffea arabica* (*Ca*); *Coffea canephora* (*Cc*) e *Coffea eugenioides* (*Ce*); (ii) avaliar a expressão desses alelos durante o desenvolvimento do fruto (iii) estudar os efeitos da seca na expressão das nsLTPs em *C. arabica*; (iv) clonar o promotor de um dos genes codificando nsLTP de *C. arabica* e testar sua regulação em plantas de tabaco transgênicas. *Northern* eletrônico foi realizado com os dados do Projeto Genoma EST Brasileiro e identificou-se o gene *CaLTP* (*Coffea arabica* Lipid Transfer Protein) altamente expresso em frutos de café. Os resultados dessa análise *in silico* foram confirmados por ensaios de RT-qPCR e de *Northern blot*, os quais destacaram a expressão preferencial deste gene em endosperma nos frutos de *C. arabica* aos 90 e 120 dias após a floração (DAF). A região promotora do gene *CaLTP3* (1,2 kb) foi isolada. Deleções 5' nessa sequência foram feitas para testar a capacidade de controlar a expressão do gene repórter *uidA* em plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*. Os ensaios histoquímicos da atividade GUS mostram que os fragmentos de 1,2 kb, 1,0 kb e 0,8 kb direcionaram a expressão de *uidA* para todos os órgãos testados da planta. Esses fragmentos promovem expressão baixa ou nula em raízes. O fragmento de 0,4 kb direcionou a expressão do gene *uidA* somente em sementes. As expressões dos homoeólogos *CaLTP* dos subgenomas de *Cc* e *Ce* de *Ca* foram identificadas usando combinações específicas de iniciadores. Os cDNAs e os genes codificando a proteína nsLTP, do tipo 2, foram clonados e sequenciados permitindo a identificação das formas ortólogas e homeólogas da *CaLTP* (*CaLTP1a*, *CaLTP1b*, *CaLTP2*, *CaLTP3a*, *CaLTP3b* e *CcLTP3*).

Palavras-chave: *Coffea*. Expressão gênica. Homoeólogos. *nsLTP*. Ortólogos Promotor

## ABSTRACT

The non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) are basic proteins characterized by conserved cysteine residues, low molecular mass and high content of  $\alpha$ -helices that were originally defined according to their ability to transfer phospholipids *in vitro*. Several studies indicate that *nsLTPs* are involved in protection mechanisms of plants against biotic stresses caused by fungi, virus and bacteria. The lipid transfer proteins are widely distributed in plant kingdom and evolutionary evidences suggest that nsLTP proteins emerged very early during land plant evolution, which may explain the large diversity of their corresponding genes. The differential expression patterns according to tissue, developmental stage and physiological condition are conferred by *nsLTP*-multigene family. These genes are also responsive to abiotic stresses such as drought, low temperature, salt treatment and heavy metals exposure. Considering the importance of nsLTPs in plant metabolism, the present study aims to (i) identify the different coffee *nsLTPs* gene homeologs corresponding to *Coffea arabica* (*Ca*) ancestor subgenomes: *Coffea canephora* (*Cc*) and *Coffea eugenoides* (*Ce*); (ii) evaluate the expression of these alleles during bean development; (iii) study the effects of drought on *nsLTP* expression in *C. arabica* and (iv) clone the promoter of one of genes encoding *C. arabica* nsLTP and to evaluate its function in transgenic tobacco plants. Electronic *Northern* were performed using electronic data from the Brazilian Genome Project EST and identified the *CaLTP* (*Coffea arabica* Lipid Transfer Protein) gene as highly expressed in coffee fruits. Results of these *in silico* analyses were validated by RT-qPCR and *Northern* blot assays which highlighted the preferential expression in *C. arabica* fruit endosperm at 90 and 120 days after flowering (DAF). The corresponding *CaLTP3* gene promoter region (1,2 kb) was also isolated. 5' end deletions of this sequence were carried out to evaluate their ability to control the expression of the *uidA* reporter gene in transgenic *Nicotiana tabacum* plants. The GUS histochemical assay showed that 1,2 kb, 1,0 kb and 0,8 kb fragments direct the *uidA* expression to all tested plant organs. Those three fragments (1,2 kb, 1,0 kb and 0,8 kb) promote low or null expression in roots. On the other hand, the 0,4 kb fragment led to the expression of the *uidA* gene only in seeds. The expression of *CaLTP*-specific homeologs from *Cc* and *Ce* subgenomes of *Ca* was also identified using several specific *primers* combination. The cDNAs and genes encoding the nsLTP type 2 protein were cloned and sequenced that allowed the identification of *CaLTP* homeologous and orthologous sequences (*CaLTP1a*, *CaLTP1b*, *CaLTP2*, *CaLTP3a*, *CaLTP3b* e *CcLTP3*).

Keywords: *Coffea*. Gene expression, Homologous, *nsLTP*. Orthologs, Promoters.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Sequência primária de proteínas de transferência de lipídeos isoladas de milho, espinafre, mamona, trigo, arroz, cevada, colza, cenoura e *Arabidopsis thaliana*. As sequências de milho, mamona, trigo e arroz foram determinadas por análise das proteínas purificadas e as outras sequências foram deduzidas dos clones de cDNA. Os oito resíduos de cisteína conservados estão em destaque. 25

Figura 2 (A) Representação esquemática dos padrões de pareamento das cisteínas das nsLTP1 e nsLTP2 mostrando alta similaridade exceto para o motivo –CXC. (B) Orientação da cadeia lateral de nsLTP1 e nsLTP2 no motivo CXC é mostrado pelo modelo bola e bastão (setas). O Asn<sup>49</sup> hidrofílico presente na estrutura nsLTP1 é projetado para a periferia da proteína, enquanto o hidrofóbico Phe<sup>36</sup> da nsLTP2 está internalizado na molécula. ....28

Figura 3 Possíveis modos de evolução de genes parálogos na região codificadora da proteína após eventos de duplicação gênica.....30

Figura 4 Frutos de *C. arabica* (220-250 DAF): O endosperma representa o principal tecido e o perisperma está reduzido à película prateada. ....35

Figura 5 História evolutiva do alotetraplóide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diplóides *C. eugenoides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás (m.a.a) a partir do cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenoides*. (B) Origem das principais cultivares de *C. arabica*. ....37

Figura 6 Produção de café - Safra de 2012: Participação percentual por Unidade da Federação (UF). ....38

Figura 7 Evolução do consumo interno anual de café no Brasil em milhões de sacas. ....39

Figura 8 Pontos de controle da expressão gênica: (1) Controle transcricional; (2) Controle de processamento de RNA; (3) Controle do transporte de RNA; (4) Controle da tradução; (5) Controle pós traducional.....44

Figura 9 O promotor mínimo da RNA polimerase II pode apresentar um TATA box a aproximadamente 30pb a montante do sítio de iniciação (Inr). Os promotores sem TATA box podem apresentar o elemento promotor a jusante (DPE). O TATA box possui sequência consenso TATAA. O Inr possui bases pirimídicas (Y) ao redor de um núcleo conservado de CA (citosina e adenina). A sequência apresenta a fita codificadora.....45

Figura 10 Metodologia Genome Walker ..... 73

Figura 11 Representação esquemática com mapa do vetor pCR®2.1 linearizado. O sítio em que o produto de PCR é ligado está em destaque na figura. .... 76

Figura 12 Mapa do vetor pBI121.....81

Figura 13 *Northern* eletrônico realizado no Banco de ESTs do Projeto Genoma Café Brasileiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>) Gráfico exibe o perfil de expressão em porcentagem (%) do *contig* 18885 baseado na frequência relativa de ESTs (ESTs do *contig*/total de ESTs das bibliotecas). Frequência das ESTs que compõem o *contig* 18885 das bibliotecas do grupo A (bibliotecas cDNA de frutos nos estádios iniciais do desenvolvimento) e B (outras bibliotecas). .... 88

Figura 14 Alinhamento das sequências nucleicas de *nsLTPs* putativas de *Coffea spp* com o *contig* 22413. Os *contigs* SGNCaU607388 e SGNCaU610393 de *C. arabica* (*Ca*), o *contig* SGNCCU613906 de *C. canephora* (*Cc*) apresentam inserções/deleções em suas regiões UTRs em comparação ao *contig* 22413 de *C. racemosa* (*Cr*). A região 3'UTR de 13-pb (destacada no quadro) representa uma deleção nos *contigs* SGNCaU607388 e SGNCCU613906. Os nucleotídeos demarcados em cinza representam polimorfismos de base única. As setas horizontais representam os *primers* LTP F3 e F4 usados para amplificar a sonda para os experimentos de *Northern* blot. A sequência *CaLTP* está representada pelo *contig* 22413.....90

Figura 15 Perfil de expressão do gene *CaLTP* em *C. arabica*. (A) RNA total (20 µg) de raízes (Rz), folhas (Fo) de *C. arabica* var Catuaí amarelo e frutos inteiros (Fr) de 120 DAF de *C. arabica* var I59 (safra 2008/2009), separadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante. (B) Hibridização da sonda de *CaLTP* exclusivamente com transcritos de fruto de *C. arabica* var I59. (C) RNA total (20 µg) de frutos inteiros de *C. arabica* var I59 em diferentes estádios do

desenvolvimento: 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 DAF. (D) Hibridização da sonda de *CaLTP* nos transcritos de frutos com 120 DAF. Os rRNAs foram corados com brometo de etídio para comparação da quantidade e qualidade das amostras (A e C). .....93

Figura 16 Caracterização do perfil de expressão de *CaLTP* em frutos de *C. arabica* var I59 (safra 2006/2007) dissecados em polpa (Po), perisperma (Pe) e endosperma (End). As isobarras verticais pretas representam a expressão dos homoeólogos de *C. canephora* (*CaCc*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R1 enquanto as isobarras cinzas representam os homoeólogos de *C. eugenioides* (*CaCe*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R2. Os níveis de expressão relativa do transcrito de *CaLTP* em semente (A) e polpa (B) foram indicados usando como referência a expressão do gene *UBI*. Os resultados foram obtidos usando as amostras 60 DAF Pe e 30 DAF como calibradores internos (A e B, respectivamente). Em cada um dos casos, os valores são médias das triplicatas técnicas  $\pm$  o valor do desvio padrão. ....94

Figura 17 Perfil de expressão do gene *CaLTP* em meristemas de *C. arabica* var Rubi e I59 em plantas não irrigadas (NI) e irrigadas (I). As isobarras pretas representam os homoeólogos de *C. canephora* (*CaCc*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R1 enquanto as isobarras cinzas representam os homoeólogos de *C. eugenioides* (*CaCe*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R2. Os níveis de expressão relativa do transcrito de *nsLTP* em meristemas foram indicados usando como referência o gene *UBI*. Os resultados foram obtidos usando a amostra Rubi I como calibrador interno. Em cada um dos casos, os valores são médias das triplicatas técnicas  $\pm$  o valor do desvio padrão. ....96

Figura 18 Índices de precipitação dos meses de abril a novembro de 2006 (A) e 2008 (B). O ano de 2008 apresentou 4 meses de estiagem enquanto o ano de 2006 apresentou 3 meses. ....99

Figura 19 Sequências nucleicas de *nsLTPs* de *Coffea spp.* Alinhamento (A) e cladograma (B) dos genes e cDNAs de *nsLTPs*. Os genes *CaLTP1a*, *CaLTP1b*, *CaLTP2*, *CaLTP3a*, *CaLTP3b* foram obtidos a partir do DNAg de *C. arabica* var Mundo Novo e a sequência gênica *CcLTP3* foi obtida do DNAg de *C. canephora* var Conilon (clone 120). O símbolo \* representa a sequência gênica e o símbolo (1) indica as sequências de cDNA e gene equivalentes. Todos os cDNAs foram obtidos a partir de *C. arabica* var I59. As setas horizontais (A) representam os *primers* utilizados para amplificar os genes e cDNAs. Os



nucleotídeos destacados em cinza evidenciam os polimorfismos de base única. O gene *CcLTP3* de *C. canephora* e o cDNA de *C. arabica* são similares, porém, foram amplificados de espécies diferentes e por este motivo receberam a simbologia \*\*. 103

Figura 20 Sequências proteicas de nsLTPs de *Coffea spp.* Alinhamento (A) e cladograma (B) das proteínas CaLTP1a, CaLTP1b, CaLTP3a, CaLTP3b obtidas com sequências deduzidas dos genes previamente clonados a partir de *C. arabica* var Mundo Novo e do gene *CcLTP3* de *C. canephora* var Conilon (clone 120). As sequências proteicas P-22413 e P-U613906 foram deduzidas das sequências do *contig* 22413 e do unigene SGNCCU613906, respectivamente. O símbolo \* representa a sequência das proteínas deduzidas das sequências gênica e o símbolo (1) indica as sequências das proteínas deduzidas de sequências de cDNA e gene equivalentes. Todos os cDNAs foram obtidos a partir de *C. arabica* var I59. Os aminoácidos destacados em cinza evidenciam as mutações missense. A sequência proteica CcLTP3 foi obtida da sequência do gene CcLTP3 de *C. canephora* e do cDNA CaLTP3 de *C. arabica* que, mesmo isoladas de espécies diferentes em *CcLTP3*, são similares receberam a simbologia \*\*. 104

Figura 21 Estrutura tridimensional da CaLTP3 de *C. arabica* do tipo 2. (A) A estrutura evidencia os aminoácidos com propriedades físico-químicas apolares (vermelho e azul). (B) Identificação da estrutura C<sub>5</sub>XC<sub>6</sub> com os aminoácidos Leucina (verde), Cisteína (amarelo) e Fenilalanina (roxo) evidenciando o padrão de substituição do X por uma Leucina. (C) Estrutura completa da molécula com todos os aminoácidos permite identificar a pequena cavidade hidrofóbica triangular em vermelho e a calda C-terminal em azul (A e C). 108

Figura 22 Isolamento do promotor de *CaLTP3*. Migração eletroforética dos fragmentos promotores obtidos a partir das bibliotecas do kit Genome Walker em gel de agarose. M: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Os números representam os fragmentos amplificados, 1: 1AM (Biblioteca DraI – 1300pb), 2 : 2AM (EcoRV – 850pb), 3: 3AM (3PvuII, 950pb) e 4: 4AM (Stu I – 1900). 109

Figura 23 Representação esquemática das construções com os diferentes fragmentos promotores de *CaLTP3* em substituição ao promotor *CaMV35S* no vetor pBI121. 110

Figura 24 Alinhamento das sequências promotoras *CaLTP3* e regiões codificadoras homeólogas de *CaLTP*. (A) Representação esquemática da divergência nucleotídica observada nas sequências alinhadas. (B e C) Representação dos fragmentos promotores (*pCaLP3* de 1253 pb, 1048 pb, 828 pb, 451pb), sequência promotora consenso obtida por GW (*CaLTP3* GW) e sequência dos genes homoeólogos *CaLTP* (*CaLTP1a*, *CaLTP1b*, *CaLTP2*, *CaLTP3a*, *CaLTP3b*, *CcLTP3*). As setas representam o sentido de orientação das sequências. (B) Visão global do alinhamento onde a região destacada em vermelho está ampliada em C. (C) Os nucleotídeos em verde representam os polimorfismos de base única desta região. A sequência consenso do GW está em destaque. O quadro (1) evidencia a similaridade dos fragmentos promotores com a sequência promotora consenso do GW. O quadro (2) mostra a região de anelamento dos *primers* dos genes homoeólogos de *CaLTP*. O quadro (3) identifica região de similaridade entre a sequência GW e os genes homoeólogos.

..... 112

Figura 25: Sequência promotora consenso do gene *CaLTP3* obtida por Genome Walker O motivo TATA Box (TATAAAT) e o sítio de início da tradução (ATG) estão destacados em caixas. Os *primers* utilizados para amplificar fragmentos promotores para o ensaio de expressão em *Nicotiana tabacum* estão identificados por setas horizontais. A região codificadora parcial encontra-se sublinhada. Elementos *cis* relacionados à regulação órgão-específica e responsiva à estresse biótico e abiótico estão identificados na sequência e descritos na legenda acima. .... 114

Figura 26 Sequência promotora consenso do gene *CaLTP3*. A ilustração permite identificar a localização e frequência dos motivos *cis* encontrados na sequência promotora do gene *CaLTP3* por meio de análise nos bancos PlantCare, PLACE e Transfac 6. Didaticamente, os elementos *cis* foram agrupados de acordo com descrições da literatura em (A) grupo de elementos basais, (B) grupo relacionado a expressão órgão-específica, (C) grupo endosperma-específicos e (D) grupo de elementos *in tandem*. As barras horizontais na parte superior da figura ilustram os fragmentos promotores utilizados para o ensaio de expressão em *Nicotiana tabacum*..... 118

Figura 27 Plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com os fragmentos promotores do gene *CaLTP3*. (A) Plântulas controle (não transformadas) em meio MS sem antibióticos (esquerda) e em meio de seleção MS com os antibióticos Canamicina [ $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] e Cefotaxima [ $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] (direita) (B) Dicos foliares de plantas transformadas com o fragmento promotor de 1048 pb do gene *CaLTP3*. O círculo destaca a

regeneração de brotos transformados após seis semanas em meio de seleção. (C) Plantas jovens de *N. tabacum* que foram transferidas dos meios de seleção em tubos de ensaios para substrato vegetal. (D) Plantas de *N. tabacum* aclimatadas em casa de vegetação e cobertas com sacos durante o período reprodutivo para evitar o fluxo gênico entre as plantas transformadas. (E) Ensaio histoquímico das plantas transformadas e não transformadas. .... 119

Figura 28 Fotomicrografia do ensaio histoquímico GUS em plantas de *N. tabacum* transformadas com vetores binários contendo diferentes fragmentos do promotor do gene *CaLTP3* de *C. arabica*. (A) Plantas não transgênicas (controle negativo). (B, C, D e E) Plantas transgênicas transformadas com diferentes fragmentos do promotor do gene *CaLTP3* (0.45, 0.82, 1.0 e 1,2 kb, respectivamente) a montante do gene repórter *uidA*. (F) Plantas transgênicas transformadas com o promotor 35S a montante do gene *uidA* (controle positivo). Da esquerda para a direita os tecidos examinados foram os seguintes: raízes e folhas, frutos, sementes, gineceu, pétalas e anteras. .... 121

Figura 29 Controle de regulação dos fragmentos promotores de *CaLTP3* no nível de atividade GUS em folhas de *N. tabacum*. Os valores de atividade GUS para as plantas transformadas (pBI121 [planta 4], pCaLTP3\_451 [planta 7] e 828 [planta 5] e não transformadas (NT) [planta 4] analisadas foram obtidos pelo valor médio das triplicatas técnicas. T<sub>20</sub> e T<sub>0</sub> referem-se aos tempos de reação da enzima GUS e substrato MUG a 37 °C. .... 125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Padrão de expressão de alguns genes que codificam proteínas <i>nsLTPs</i> .....	33
Tabela 2 Promotores de genes do cafeeiro .....	54
Tabela 3 Relação das bibliotecas geradas pelo projeto Genoma Café (modificado de VIERA et al., 2006) que foram contrastadas (grupos A e B) pela análise de <i>Northern</i> eletrônico.....	62
Tabela 4. Lista dos <i>primers</i> utilizados durante os experimentos de <i>Northern</i> blot (i), PCR (ii), RT-qPCR (iii), para isolar os diferentes fragmentos da região promotora (iv) e sequenciamento (v). As letras minúsculas sobrescritas entre parênteses representam as combinações dos pares de <i>primers</i> utilizados. F: Foward, R: Reverse. 1AM, 2AM, 3AM e 4AM: Diferentes fragmentos promotores gerados por amplificação nas bibliotecas utilizando o kit Genome Walker.....	65
Tabela 5 Programa de termociclagem utilizado nas reações de amplificação pela técnica de GW. O número ( <i>n</i> ) de repetições do ciclo 6 difere-se entre as reações, assumindo os valores de 31 e 20 para a primeira e segunda, respectivamente...	75
Tabela 6 Distribuição de plantas T <sub>0</sub> avaliadas no ensaio de expressão. As plantas não transformadas (NT) foram utilizadas como controle negativo dos experimentos.....	120
Tabela 7 Segregação Mendeliana (3:1) do gene <i>npt II</i> em plantas de <i>N. tabacum</i> transgênicas da progênie T <sub>1</sub> transformadas com os promotores de 1253 pb, 1048 pb, 828 pb e 451 pb no vetor pBI 121. *Plantas selecionadas para o ensaio fluorimétrico.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn, Asp	Aminoácido Asparagina
Arg	Aminoácido Arginina
Ala	Aminoácido Alanina
Ca	<i>Coffea arabica</i>
CaCc	Subgenoma de <i>Coffea canephora</i> em <i>Coffea arabica</i>
CaCe	Subgenoma de <i>Coffea eugenoides</i> em <i>Coffea arabica</i>
CaLTP	<i>Coffea arabica</i> Lipid Transfer Protein
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus
Cc	<i>Coffea canephora</i>
cDNA	DNA complementar
Ce	<i>Coffea eugenoides</i>
Cr	<i>Coffea racemosa</i>
DAF	Dias Após a Floração
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg.	DNA genômico
End	Endosperma
EST	Expressed sequence tag markers
FTs.	Fatores de transcrição
g	Grama
<sub>x</sub> g	Força centrífuga relativa
GUS.	Gene da beta-glucuronidase
GW	Genome Walker
I	Irrigado
Ile	Aminoácido Isoleucina
Inr	Início da transcrição
I59	IAPAR 59
Kb	Kilobases
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Aminoácido Leucina
LTP	Lipid Transfer Protein
M.	molar
m.a.a	milhões de anos atrás
min.	minutos
mL.	mililitros
µg.	micrograma
µl.	microlitros
MPa.	Megapascal
MS	Meio de cultura Murashige & Skoong
MUG	β-D-Glucuronide
NaAc	Acetato de Sódio

ng.	Nanogramas
NI	Não irrigado
NOS	Gene da nopalina sintase
<i>NptII</i>	Neomicina fosfotransferase
NT	Não transformada
nsLTP	<u>N</u> on <u>s</u> pecific <u>L</u> ipid <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein - Proteína de Transferência de Lipídeos não específica
pb.	pares de base
PCR.	reação da polimerase em cadeia
pd.	<i>pre-dawn water potential</i> - potencial hídrico de antemanhã
Pe	Perisperma
Po	Polpa
Phe	Fenilalanina
PLACE	Banco de Dados Plant <i>Cis</i> -acting Regulatory DNA elements
PlantCARE	Banco de Dados Plant <i>Cis</i> -Acting Regulatory Elements
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
rpm.	rotações por minuto
seg.	segundos
SNPs	<u>S</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism – Polimorfismo de nucleotídeo único
spp	Espécies
UBI	Gene da Ubiquitina
UidA	Gene da beta-glucuronidase
UF	Unidade da Federação
UTR	Untranslated region – Região transcrita e não traduzida
Val	Aminoácido Valina
Var	Variedade

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>24</b>
2.1 Proteínas LTPs em plantas.....	24
2.2 O cafeeiro.....	35
2.2.1 Taxonomia .....	35
2.2.2 Importância econômica.....	36
2.2.3 Genômica do cafeeiro .....	39
2.2.4 Melhoramento genético de cafeeiro.....	40
2.3 Regulação transcricional em eucariotos.....	44
2.3.1 Promotores utilizados na regulação da transcrição .....	47
2.3.2 Promotores preferencialmente expressos em frutos/sementes .....	50
2.3.3 Promotores de genes do cafeeiro .....	52
2.4 Projeto Genoma do Cafeeiro.....	55
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>58</b>
Objetivos específicos .....	59
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
3.1 Identificação <i>in silico</i> de gene fruto-específico no Banco de ESTs do Projeto Genoma Café (cafEST).....	61
3.2 Desenho dos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....	63
3.3 Material Vegetal .....	66
3.4 Extração de DNA.....	67
3.5 Extração de RNA .....	68
3.6 <i>Northern blot</i> .....	69
3.7 RT-qPCR .....	70
3.8 Isolamento dos cDNAs e genes homoeólogos e ortólogos de <i>CaLTP</i> .....	71
3.9 Isolamento do promotor de <i>CaLTP3</i> .....	73
3.10 Clonagem dos promotores .....	75
3.11 Mini extração de plasmídeos .....	77
3.12 Sequenciamento de DNA.....	78
3.13 Análise <i>in silico</i> da região promotora .....	79
3.14 Isolamento dos diferentes fragmentos da região promotora do gene <i>CaLTP3</i> .....	80
3.15 Clonagem em vetor binário e transformação de <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> .....	81
3.16 Cultura de tecidos .....	82
3.16.1 Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	83
3.16.2 Seleção das plantas transformadas.....	84
3.16.3 Aclimação .....	84
3.17 Análises do número de cópias das plantas transformadas .....	85

3.18 Ensaio Histoquímico.....	85
3.19 Ensaio Fluorimétrico.....	86
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
4.1 Análises <i>in silico</i> de <i>contigs nsLTPs</i> em <i>Coffea spp.</i> .....	87
4.2 Análise do perfil de expressão do gene <i>CaLTP</i> em <i>C. arabica</i> .....	91
4.3 Caracterização dos cDNAs e genes de <i>nsLTPs</i> de café .....	101
4.4 Isolamento e análise do promotor de <i>CaLTP3</i> .....	109
4.5 Ensaio de expressão dos fragmentos promotores do gene <i>CaLTP3</i> em <i>Nicotiana tabacum</i> .....	119
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>127</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>128</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>129</b>
<b>8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>130</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) se ligam a ácidos graxos e transportam moléculas lipídicas entre membranas *in vitro*, entretanto, o seu papel biológico *in vivo* ainda não está claro (CHENG et al., 2004). As LTPs de plantas são codificadas por uma pequena família multigênica presente em diversas espécies, e são frequentemente designadas LTPs não específicas (nsLTPs) devido a sua afinidade por múltiplos substratos lipídicos (KADER, 1996). Existem evidências de que essas proteínas estão presentes em diversos tecidos com funções variadas (WANG et al., 2012). As nsLTPs são proteínas ubíquas que têm sido encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais e possuem afinidade por uma variedade de moléculas hidrofóbicas.

Todos os precursores nsLTPs conhecidos de plantas são sintetizados com um peptídeo sinal N-terminal (LIU et al., 2010) que normalmente direciona a proteína para a matrix extracelular (THOMA et al., 1994), sugerindo que essas proteínas não desempenham papéis citoplasmáticos. As nsLTPs de plantas apresentam baixo peso molecular (normalmente 6,5 a 10 kDa) com pontos isoeletrônicos (pI) básicos variando entre 8,8 e 12 (KADER, 1997). Em algumas plantas, essas proteínas são relativamente abundantes e podem representar 4 % do total de proteínas solúveis (GROSBOI et al., 1989; SOSSOUNTZOV et al., 1991).

As nsLTPs podem estar envolvidas na atividade de defesa da planta contra patógenos fúngicos e bacterianos (MOLINA e OLMEDO, 1997; KRISTENSEN et al., 2000) e participando na montagem de camadas protetoras hidrofóbicas de polímeros de superfície como ceras ou cutinas (CAMERON et al., 2006; YEATS e ROSE, 2008). Além disso, vários estudos evidenciam que a expressão dos genes que codificam as nsLTPs também são induzidos em resposta a estresses abióticos como déficit hídrico, excesso de sais (JANG et al.,

2004), baixas temperaturas (YUBERO-SERRANO et al., 2003) e exposições à metais pesados (HOLLENBACH et al., 1997).

O metabolismo de lipídeos durante o desenvolvimento do grão de café é um dos aspectos dessa cultura que ainda precisam ser esclarecidos (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). O Café é a *commodity* de agricultura tropical de maior negociação no mundo (ICO, 2012) e o teor de lipídeos do grão está diretamente relacionado com a qualidade da bebida e aroma. A maioria dos lipídeos está localizada no endosperma do grão verde de café e uma pequena quantidade, que compõe a cera do café, está presente na camada externa do grão (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006).

Apenas duas espécies do cafeeiro são plantadas comercialmente, *Coffea arabica* (café Arábica) e *Coffea canephora* (café Robusta), correspondendo, respectivamente, a 70 % e 30 % do mercado internacional (ICO, 2012). Por apresentar uma qualidade da bebida superior quando comparada com outras espécies, *C. arabica* destaca-se como a espécie mais cultivada (PONCET et al., 2007). *C. arabica* é uma espécie alotetraplóide ( $2n = 4x = 44$ ) originada a 1 milhão de anos a partir da hibridização natural de dois genomas ancestrais diplóides, *C. canephora* e *C. eugenoides* (LASHERMES et al., 1999). Devido à autopolinização de suas flores, a espécie é caracterizada por uma baixa diversidade genética (HATANAKA et al., 1999). Por outro lado, *C. canephora* é uma espécie diplóide ( $2n = 2x = 22$ ), possui alta variabilidade genética e capacidade de se adaptar às mais variadas condições climáticas (BERTRAND et al., 2003). Produz um café de menor qualidade, mais adequado à produção de café solúvel (HATANAKA et al., 1999).

Uma vez que *C. arabica* é perene, autógama e tem baixa variabilidade genética, a transgenia apresenta-se como uma alternativa promissora para agregar características fenotípicas de interesse como resistência à patógenos, tolerância à seca ou melhoria da qualidade da bebida. Para a obtenção de plantas

geneticamente modificadas (PGM) com o fenótipo desejável, é fundamental o controle de expressão do transgene que assegure níveis adequados e somente nos tecidos desejados visando minimizar os efeitos indesejáveis da expressão constitutiva.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Proteínas LTPs em plantas

As LTPs são caracterizadas pela capacidade de se ligarem a ácidos graxos e transferirem lipídeos *in vitro* entre membranas (KADER, 1996). Devido à habilidade de associação das LTPs a várias moléculas lipídicas hidrofóbicas tais como, fosfatidilgliceróis, fosfatidilcolinas e colesterol essas proteínas são mais conhecidas como proteínas de transferência de lipídeos não específicas (nsLTPs) (CHENG et al., 2004).

Lipídeos são hidrocarbonetos insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos que são comumente translocados entre membranas subcelulares permitindo diversas atividades metabólicas. Os lipídeos definem a interface entre organelas, células e organismos, fornecem fonte de energia altamente rica de carbono reduzido, podem agir como moléculas sinalizadoras importantes e como hormônios (YEATS e ROSE, 2008). Em eucariotos, o transporte de lipídeos diferentes entre as membranas celulares pode ocorrer por vias vesiculares e não vesiculares (MAXFIELD e MONDAL, 2006). Todos os precursores nsLTPs conhecidos de plantas são sintetizados com um peptídeo sinal N-terminal (LIU et al., 2010) que normalmente direciona a proteína para a matrix extracelular (THOMA et al., 1994), sugerindo que essas proteínas não desempenham papéis citoplasmáticos.

As LTPs de plantas são frequentemente identificadas em plantas com flores (YEATS e ROSE, 2008). A primeira proteína LTP em plantas foi isolada de tubérculos de batata (KADER, 1975) e somente caracterizada alguns anos depois a partir de folhas de espinafre (KADER et al., 1984). As nsLTPs também já foram isoladas de cenoura (STERK et al., 1991), colza (FOSTER et al., 1992), mamona (YAMADA, M., 1992), *Arabidopsis thaliana* (THOMA et al., 1994) ,

arroz (VIGNOLS, et al., 1994), cevada (WHITE et al., 1994), trigo (DIERYCK et al., 1995), milho (KADER, 1996), girassol (REGENTE e LA CANAL, 2000), feijão (CARVALHO et al., 2001), morango (YUBERO-SERRANO et al., 2003), pimentão (DIZ et al., 2006), tomate (TOMASSEN et al., 2007) café (ZOTTICH et al., 2011), dentre outras.

Em termos de estrutura, as proteínas nsLTPs consistem de 91-95 resíduos de aminoácidos diferindo em sequência, mas contendo oito resíduos de cisteínas estritamente conservados (KADER, 1997) (Figura 1). Devido às quatro pontes de dissulfeto formadas entre esses resíduos, as nsLTPs são notavelmente estáveis após a purificação (LINDORFF-LARSEN e WINTHER, 2001).

	10	20	30	40		
Milho	AISC	QVASAIAPCIS	YARGQGS	PS-AGCCSGVRS	LNNAARTTADRRAA	
Espinafre	GITC	GMVSSKLAPCIG	YLKG-G---	PLGGGCCGGIK	ALNAAAATTPDRKTA	
Mamona	-VDC	GQVNSSLASCIP	FLTGAVAS-PS-	ASCCAGVQNL	KTLAPTSADRRAA	
Trigo	-IDC	GHVDSLVRPCL	SYVQG-GPG-PS-	GQCCDGVKN	LHNQARSQSDRQSA	
Arroz	CGQV	NSAVGPCLTY	ARG-GAG-PSAA-	CCSGVRS	LKAAASTTADRRTA	
Cevada	-LNC	GQVDSKMKPCL	TYVQG-GPG-PS-	GECCNGVRD	LHNQAQSSGDRQTV	
Colza	HITC	GTVTSTMTQCIS	YLTNGGPL-PSS-	CCVAVKSLN	QMAQTTPDRRQV	
Cenoura	VLTC	GQVTGALAPCL	GYLRSQVNV-PV	PLTCCNVVR	GLNNAARTTLDRKTA	
Arabidopsis	LMSC	GTVNGNLAC	CIAYL-TRG-A-	PLTQGCC	NGVTNLKNMASTTPDRQQA	
	50	60	70	80	90	
Milho	CNCL	KNAAGVS-GLN	AGNAASIP	SKCGVSI	PYTISTD	CSRNV---
Espinafre	CNCL	KSANAIAK-G	INYGKAAG	LPGMCGV	HIPYAI	SPSTNCNAVH---
Mamona	CECI	KAAAAARFP-T	IKQDAASS	LPKKCGV	DINIPIS	KTTNQCQAIN---
Trigo	CNCL	KGIARGIH-N	LNEDNARS	IPPKCGV	NLPYTIS	LNIDCSRNV---
Arroz	CNCL	KNAARGIK-GLN	AGNAASIP	SKCGVSV	PYTISAS	IDCSRVS---
Cevada	CNCL	KGIARGIH-N	LNLNNAAS	IPSKCNV	NVPYTIS	PDIDCSRIV---
Colza	CECL	KSAGKEIK-GLN	IDLVAALPT	TTCGVSL	SYPIGF	NTNCDSISIAV
Cenoura	CGCL	KQTANAVT-GLN	LNAAGLP	ARCGVNI	IPYKIS	PPTDCNRVV---
Arabidopsis	CRCL	QSAKAVGPGL	NTARAAGL	PSACKVN	IPYKIS	ASTNCNTVR---

Figura 1 Sequência primária de proteínas de transferência de lipídeos isoladas de milho, espinafre, mamona, trigo, arroz, cevada, colza, cenoura e *Arabidopsis thaliana*. As sequências de milho, mamona, trigo e arroz foram determinadas por análise das proteínas purificadas e as outras sequências foram deduzidas dos clones de cDNA. Os oito resíduos de cisteína conservados estão em destaque.

Fonte KADER, 1997 (adaptado).

As LTPs têm atraído considerável interesse devido a sua importância para aplicações industriais e saúde humana. As LTPs representam proteínas estáveis e abundantes presentes no malte da cevada, contribuindo para a qualidade da cerveja (JEGOU et al. 2000) e também têm sido identificadas como principais alergênicos humanos, particularmente detectadas em frutos da família *Rosaceae* (SALCEDO et al., 2007). A utilização prática das LTPs ganhou destaque com o desenvolvimento de tomates hipoalergênicos por meio da supressão da expressão de genes LTP no fruto transgênico (LE et al. 2006; LORENZ et al. 2006). Recentemente, estudos demonstraram que as proteínas LTP de mostarda exibem atividade antiproliferativa contra células cancerosas humanas e as proteínas LTPs de café e pimenta apresentaram atividade contra fungos patogênicos para o homem como a espécie de *Candida* (NG et al., 2012).

As nsLTPs de plantas apresentam baixo peso molecular (normalmente 6,5 a 10 kDa) com pontos isoelétricos (pI) básicos variando entre 8,8 e 12 (KADER, 1997). Em algumas plantas, essas proteínas são relativamente abundantes e podem representar 4 % do total de proteínas solúveis (GROSSBOI et al., 1989; SOSSOUNTZOV et al., 1991).

No que diz respeito a sua classificação, de acordo com trabalho desenvolvido por Douliez et. al (2000), as nsLTPs podem ser divididas em dois grupos principais de acordo com sua massa molecular, nsLTP1 (9kDa) e nsLTP2 (7kDa). Em 2008, uma nova classificação de 267 nsLTPs foi proposta usando formas maduras prováveis de arroz, trigo e *Arabidopsis thaliana* (BOUTROT et al., 2008). Recentemente, Wang et al. (2012) propuseram uma nova classificação das nsLTPs em cinco diferentes tipos com base na matriz de similaridade de sequência e na propriedade de seus 8 motivos de cisteína.

Além do motivo estritamente conservado de oito cisteínas que contribui para a formação das quatro pontes dissulfeto de todas as LTPs, as proteínas da família

1 possuem resíduos conservados específicos. Pequenos aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Val, Leu, Ala) aparecem ao longo da sequência da proteína LTP do tipo 1 e contribuem para formar o canal hidrofóbico. O aminoácido Tyr na posição 16 e os dois resíduos de aminoácido de carga oposta no início da terceira  $\alpha$ -hélice (Asp43 e Arg44 na proteína) são características conservadas para as LTPs do tipo 1 (YEATS e ROSE, 2008).

Em comparação a estas LTPs, existem menos estudos estruturais para as proteínas LTPs do tipo 2. As cisteínas 5 e 6 do núcleo (CXC) são ligadas de modo diferente nas LTPs do tipo 1 e do tipo 2. No primeiro caso, C<sub>5</sub> forma uma ligação dissulfeto com C<sub>8</sub> e C<sub>6</sub> com C<sub>1</sub>, enquanto que nas LTPs do tipo 2, C<sub>5</sub> forma ponte dissulfeto com C<sub>1</sub> e C<sub>6</sub> com C<sub>8</sub> (CHENG et al. 2004) (Figura 2). A cavidade da LTP do tipo 2 é menor do que a cavidade da proteína do tipo 1, e mais flexível, permitindo a acomodação de uma ampla variedade de lipídeos, incluindo esteróis (HOH et al. 2005).

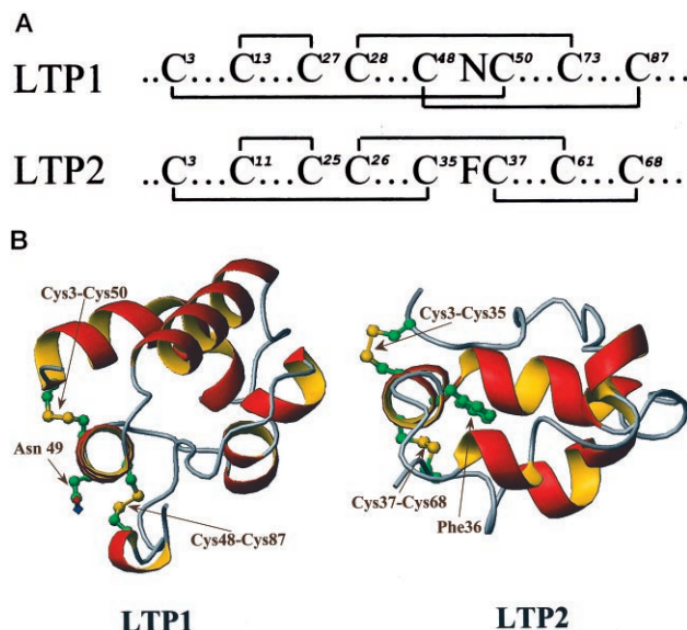


Figura 2 (A) Representação esquemática dos padrões de pareamento das cisteínas das nsLTP1 e nsLTP2 mostrando alta similaridade exceto para o motivo –CXC. (B) Orientação da cadeia lateral de nsLTP1 e nsLTP2 no motivo CXC é mostrado pelo modelo bola e bastão (setas). O Asn<sup>49</sup> hidrofílico presente na estrutura nsLTP1 é projetado para a periferia da proteína, enquanto o hidrofóbico Phe<sup>36</sup> da nsLTP2 está internalizado na molécula.

Fonte SAMUEL et al., 2002.

Embora ainda não exista nenhuma teoria consolidada da função destas proteínas *in vivo*, os avanços das técnicas de sequenciamento de nova geração e os esforços para o sequenciamento do genoma de muitas plantas nos últimos anos, revelaram que as LTPs e sequências ‘LTP-like’ compreendem uma grande família de genes ubíquos em plantas superiores, e, portanto, há informação disponível para elucidar a diversidade funcional destas proteínas (YEATS e ROSE, 2008). Embora inicialmente identificadas como mediadoras potenciais do transporte intracelular de lipídeos de membrana, a demonstração da localização extracelular das LTPs sugere que este não é o papel biológico destas proteínas.



No lugar desta hipótese simples com base na sua atividade *in vitro*, numerosos estudos ao longo das últimas duas décadas, resultaram em uma relação com uma infinidade de processos biológicos. As nsLTPs podem estar envolvidas na atividade de defesa da planta contra patógenos fúngicos e bacterianos (MOLINA e OLMEDO, 1997; KRISTENSEN et al., 2000) e participando na montagem de camadas protetoras hidrofóbicas de polímeros de superfície como ceras ou cutinas (CAMERON et al., 2006; YEATS e ROSE, 2008). Além disso, vários estudos evidenciam que a expressão dos genes que codificam as nsLTPs também são induzidos em resposta a estresses abióticos como déficit hídrico, excesso de sais (JANG et al., 2004), baixas temperaturas (YUBERO-SERRANO et al., 2003) e exposições à metais pesados (HOLLENBACH et al., 1997).

A poliploidia é a causa de várias mudanças na expressão dos genes (JANG et al., 2008) e a poliploidização constitui um modo comum de evolução nas plantas com flores (VIDAL et al., 2010). Análises moleculares sugerem que os genomas da maioria (>90%) das angiospermas existentes retêm evidências de uma ou mais duplicações no genoma (CUI et al., 2006). Foram identificados pelo menos 15 genes *nsLTP* no genoma de *Arabidopsis thaliana* (ARONDEL et al., 2000). Estudos de Jang et al (2007) sugerem que os genes nsLTP sofreram duplicação independente seguida por diversificação funcional nas plantas superiores, o que ocorreu durante a especiação. No entanto, no caso de genes duplicados e conservados, com alterações nas sequências gênicas ou nos elementos gênicos *cis*-reguladores durante a especiação, há possibilidade da existência de diversificação das funções ou alterações no tempo, localização e número relativo dos transcritos (MOORE e PURUGGANAN, 2005 ) (Figura 3).

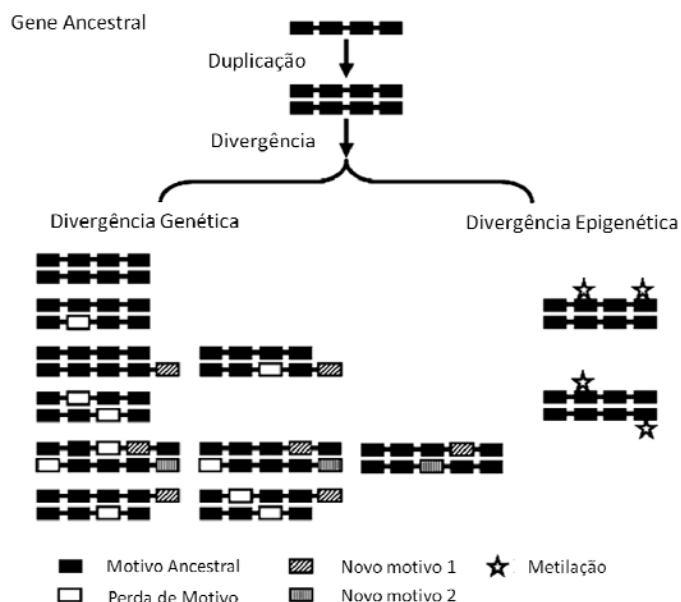


Figura 3 Possíveis modos de evolução de genes parálogos na região codificadora da proteína após eventos de duplicação gênica. Fonte YANG et al., 2006 (adaptado)

O primeiro cDNA codificando uma LTP de planta foi isolado de plântulas de milho no final dos anos 80 (TCHANG et al., 1988) e posteriormente foi observado que vários cDNAs codificavam LTPs nesta espécie, sugerindo a existência de uma complexa família multigênica (KADER, 1997). Há um complexo padrão de expressão dos genes *nsLTP* em diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições fisiológicas dentre as espécies. Um mecanismo de *splicing* alternativo pode existir nos RNAs heterogêneo nucleares (hnRNA) que codificam essas proteínas (ARONDEL et al., 1991). O *splicing* alternativo é um importante mecanismo pós-transcricional regulador da expressão gênica, que aumenta a complexidade do transcrito uma vez que há produção de transcritos múltiplos a partir de um único gene (REDDY, 2007). Análises de

sequências de cDNAs e DNAs de *nsLTPs* de trigo indicam que os genes *nsLTPs* do tipo 1 são interrompidos por um único íntron enquanto os genes *nsLTPs* do tipo 2 parecem não ter íntrons (BOUTROT et al., 2005; 2008). Análises comparativas dos genes *TaLTP9.2b* (trigo) e os genes relacionados *SbLtp2* (sorgo), *HvBl4.2*, *HvBl4.6* e *HvBl4.9* (cevada) sugerem que a presença do íntron é um traço ancestral contemporâneo para a divisão entre os genes *nsLTPs* do tipo 1 e do tipo 2 e, que a perda do íntron é uma característica gênica derivada (BOUTROT et al., 2005).

Dentre os variados perfis de expressão observados para os genes *nsLTPs*, a expressão nas porções aéreas das plantas (folhas e caules), nas inflorescências e nos estádios iniciais do desenvolvimento, como em cotilédones embrionários e primórdios foliares foram detectados em plantas de *A. thaliana* (THOMA et al., 1994). Em folhas de tabaco, o perfil de expressão de *Ltp1* foi mais alto em plantas jovens do que em maduras, especificamente no meristema apical e tecido vascular. Além disso, a expressão de *Ltp1* é também mais alta na parte superior da planta se comparado a parte basal, sugerindo que esses genes que codificam *nsLTPs* são expressos de acordo com o gradiente de desenvolvimento da planta (FLEMING et al., 1992). O mesmo grupo de trabalho destacou que nenhum transcrito que codifica *nsLTP* foi detectado nas raízes. Em trigo, genes *nsLTPs* apresentaram complexo padrão de expressão nas sementes em desenvolvimento (BOUTROT et al., 2005). Há também estudos que evidenciam a expressão de genes *nsLTP* em resposta a atividade antifúngica como a proteína LTP identificada em sementes de *Coffea canephora* (Cc-LTP1) com atividade de  $\alpha$  amilase (ZOTTICH et al., 2011).

Os órgãos aéreos de todas as plantas terrestres são cobertos com uma estrutura denominada cutícula, que consiste de cutina, um poliéster de ácidos graxos (HEREDIA, 2003) e uma variedade de compostos orgânicos solúveis com alto ponto de fusão, genericamente referidos como ceras (JETTER et al.

2006). A localização extracelular das LTPs levou a hipótese de que essas proteínas são ativas em processos que requerem o transporte de lipídeos para a parede celular (KADER, 1997). Uma vez que os precursores de lipídeos da cutícula são sintetizados no interior das células epidérmicas e devem passar por meio da parede celular hidrofílica para formar a cutícula em desenvolvimento, as LTPs têm sido propostas como proteínas transportadoras destes compostos. Embora nenhuma evidência direta tenha sido relacionada a este papel, a expressão das LTPs do tipo 1 na epiderme está correlacionada ao acúmulo de cera (SUH et al. 2005) e ao aumento da expressão das LTPs (CAMERON et al. 2006), o que suporta esta hipótese.

As LTPs podem ser componentes importantes na defesa contra patógenos bacterianos e fúngicos, e os primeiros indícios deste papel biológico surgiram a partir dos extratos proteicos de rabanete (*Raphanus sativus*) (TERRAS et al. 1992), cevada (*Hordeum vulgare*) (MOLINA et al. 1993), *Arabidopsis thaliana* (SEGURA et al. 1993), espinafre (*Spinacia oleracea*) (SEGURA et al. 1993) e sementes de cebola (*Allium cepa*) (CAMMUE et al., 1995). Cada uma destas isoformas inibe o crescimento de patógenos bacterianos e fúngicos em graus variados, dependendo do agente patogênico e da isoforma. A presença de íons de Cálcio leva a uma diminuição na eficácia antimicrobiana da proteína *in vitro* (CAMMUE et al. 1995). O papel de defesa das LTPs é embasado em seus padrões de expressão, uma vez que muitas isoformas são induzidas após o ataque de patógenos (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999).

Com a evidência da diversidade de funcional das LTPs, parece provável que não exista uma única função para ser atribuída a estas proteínas de forma geral. Ao invés disso, as prováveis isoformas individualmente parecem desempenhar funções biológicas específicas ou múltiplas (Tabela 1)

Tabela 1 Padrão de expressão de alguns genes que codificam proteínas *nsLTPs*

Gene	Espécie	Especificidade celular <sup>1</sup> / Indução <sup>2</sup>
<i>EP2</i>	Cenoura	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>AtLTP1</i>	<i>Arabidopsis</i>	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>9C2</i>	Milho	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>gltp1</i>	<i>Gerbera hybrida</i>	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>wax9</i>	Brócolis	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>Ltp</i>	Cevada	Células Epidérmicas <sup>1</sup>
<i>E2</i>	Colza	Células do tapete <sup>1</sup>
<i>LHM</i>	<i>Lilium henryi</i>	Células do tapete <sup>1</sup>
<i>GH3</i>	Algodão	Células da fibra <sup>1</sup>
<i>TSW12</i>	Tomate	Salinidade <sup>2</sup>
<i>gblt4</i>	Cevada	Baixa temperatura <sup>2</sup>
<i>gblt4</i>	Cevada	Ácido Abscísico <sup>2</sup>
<i>Ltp2-4</i>	Cevada	Ácido Abscísico <sup>2</sup>
<i>Ltp2-4</i>	Cevada	Patógeno fúngico <sup>2</sup>

A expressão de genes *nsLTPs* em tecidos específicos pode ser explicada por meio de regiões de controle gênico. A regulação da tecido-especificidade da região promotora do gene *ltp1* que codifica uma nsLTP de 7 kDa de cevada foi investigada pelo estudo de plantas transgênicas contendo o promotor fusionado ao gene repórter *uidA* e evidenciou a capacidade do promotor de direcionar a expressão específica ao aleurona de sementes transgênicas (SKRIVER et al., 1992; KALLA et al., 1994;). O estudo de Kovalchuk et al (2012) clonou o gene completo TdPR61 incluindo a região promotora a partir de bibliotecas BAC de *Triticum durum*. O promotor fusionado ao gene repórter GUS foi utilizado para a transformação de plantas de trigo, cevada e arroz. Trata-se de um forte e específico regulador de endosperma e embrião sendo uma importante ferramenta biotecnológica para o aumentar a qualidade do grão e características nutricionais da semente (KOVALCHUK et al., 2012.).

O fragmento promotor de 1650 pb do gene soyAP1, denominado PS-552 foi utilizado para a transformação estável de plantas de *A. thaliana* e foi mostrado que esse promotor é capaz de regular o gene repórter GUS em níveis muito altos em sementes em comparação aos outros tecidos (ZHAO et al., 2012). Outro estudo destaca o promotor de uma Ltp de girassol (*Helianthus annuus*) cujo gene é semente específico. O promotor do gene da Ltp foi clonado e caracterizado *in silico*. O fragmento de 964 pb contém vários motivos específicos de semente como o motivo AACAA, o elemento ACGT, E-boxes e GCN4. Análises funcionais dos promotores em plantas de *A. thaliana* transgênicas evidenciam a forte regulação da expressão para os tecidos embrionários (ZAVALLLO et al., 2010).

O metabolismo de lipídeos durante o desenvolvimento do grão de café é um dos aspectos dessa cultura que ainda precisam ser esclarecidos (DE CASTRO e MARRACCINI, 2006). O Café é a *commodity* de agricultura tropical mais negociada do mundo (ICO, 2012) e o teor de lipídeos do grão está diretamente relacionado com a qualidade da bebida e aroma. No gênero *Coffea*, *C. arabica*, a principal espécie produtora do mercado de grãos (ICO, 2012) é originária do cruzamento natural de *C. canephora* e *C. eugenoides* (LASHERMES et al., 1999). Nas espécies parentais de *C. arabica*, o teor de lipídeo do grão verde está entre 9,7 % e 13,8 %, (MAZZAFERA et al., 1998) respectivamente e são principalmente formados por triacilgliceróis, esteróis, tocoferóis e diterpenos (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006). Em *C. arabica* este valor está próximo de 14,4 % (MAZZAFERA et al., 1998) . A maioria dos lipídeos está localizada no endosperma do grão verde de café (Figura 4) e uma pequena quantidade, que compõe a cera do café, está presente na camada externa do grão (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006).

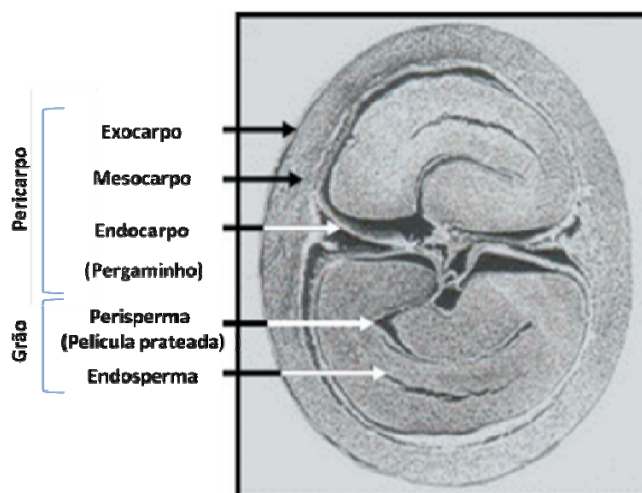


Figura 4 Frutos de *C. arabica* (220-250 DAF): O endosperma representa o principal tecido e o perisperma está reduzido à película prateada.  
Fonte GEROMEL et al., 2006 (adaptado).

Sabe-se que a fração de lipídeos dos grãos sofre modificação durante a torra e protege os compostos responsáveis pelo aroma da degradação pela torra contínua (FOLSTAR, 1985). Mesmo que o efeito do conteúdo de lipídeos na qualidade sensorial do café ainda não esteja definido, vários estudos destacam que o aumento do teor de lipídeos adicionado aos fatores de sombreamento e altitude está positivamente relacionado à qualidade da bebida (DECAZY et al., 2003; VAAST, et al., 2006).

## 2.2 O cafeeiro

### 2.2.1 Taxonomia

O cafeeiro pertence à ordem *Gentianales*, Família *Rubiaceae* subfamília *Ixoroideae* (tribo *Coffeae*). Em seu gênero (*Coffea*), podemos encontrar 103 espécies, as quais 72 (70 %) estão ameaçadas de extinção, como resultado de

uma combinação de declínio na quantidade e qualidade do habitat (DAVIS et al. 2006). Este gênero, cujo centro de origem é o continente Africano - oeste e centro da África Tropical, África oriental e Madagascar - é caracterizado por plantas dicotiledôneas, de folhas persistentes e flores hermafroditas, porte arbustivo ou arbóreo e caule lenhoso (DAVIS et al. 2006). Evolutivamente, o início da diversificação do gênero *Coffea* ocorreu entre 5 e 25 milhões de anos atrás (CUBRY et al., 2008).

### **2.2.2 Importância econômica**

Apenas duas espécies são plantadas comercialmente, *C. arabica* (café Arábica) e *C. canephora* (café Robusta), correspondendo, respectivamente, a 70 % e 30 % do mercado internacional (ICO, 2012). Por apresentar uma qualidade da bebida superior quando comparada com outras espécies, *C. arabica* destaca-se como a espécie mais cultivada e tem como local de origem o sudoeste da Etiópia e do Sudão e o norte do Quênia. Por sua vez, *C. canephora* apresenta como local de origem países que pertencem às regiões intertropicais leste, oeste e central da África (PONCET et al., 2007).

As duas variedades de *C. arabica* mais cultivadas comercialmente são a Mundo Novo e a Catuaí. A variedade Mundo Novo, oriunda de um cruzamento entre os genótipos Bourbon e Tipica (Figura 5), é caracterizada por elevada produtividade e porte alto. A variedade Catuaí, oriunda de um cruzamento entre Mundo Novo e Caturra, foi desenvolvida objetivando-se plantas de menor porte, sendo as duas variedades principais a Catuaí Vermelho e a Catuaí Amarelo (CARVALHO et al., 2008).



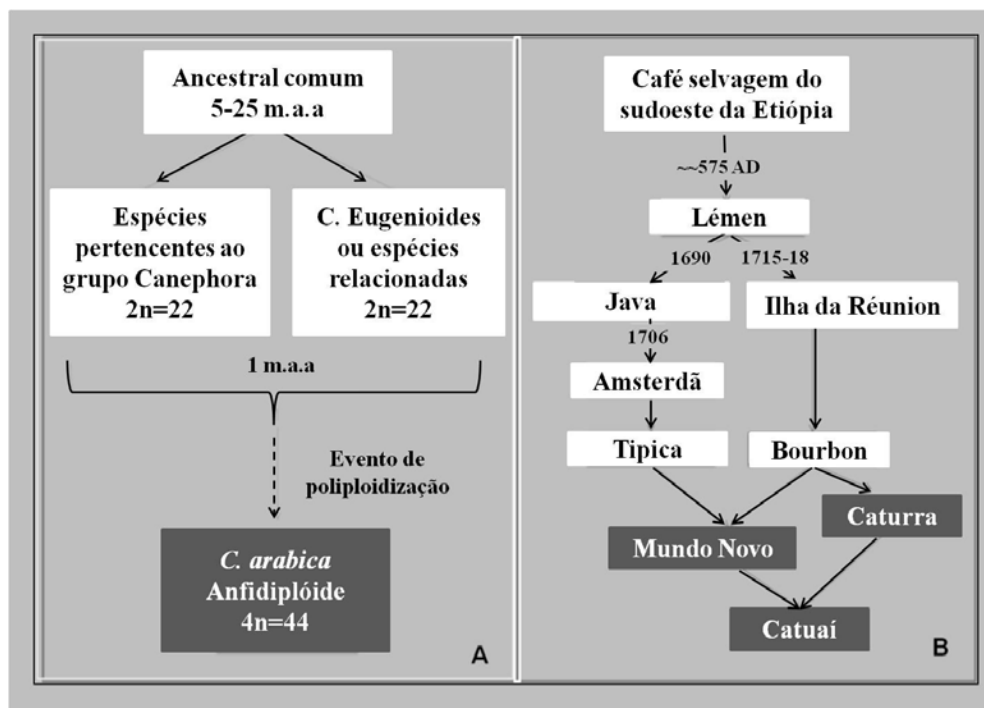


Figura 5 História evolutiva do alotetraplóide *C. arabica*. (A) Origem de *C. arabica*. Os genomas dos progenitores estão representados pelos diplóides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás (m.a.a) a partir do cruzamento de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*. (B) Origem das principais cultivares de *C. arabica*.

Fonte VIDAL et al. 2010 (adaptado).

No ano de 2011, a produção mundial de café alcançou 130 milhões de sacas (60 kg), e o Brasil foi o principal produtor, colhendo mais de 33 % do total, seguido por Vietnã com 13 % e Colômbia com 6 % (ICO, <http://www.ico.org/prices/po.htm>). Além desses, o café é produzido e exportado por outros 47 países, localizados na África, Américas do Sul e Central, Ásia e Oceania (ICO, 2012). No Brasil, o café é produzido hoje em 15 estados (Figura 6), mas os principais produtores (com 98 % da produção nacional) são MG, ES, SP, BA, PR, RO e RJ (CONAB, 2012). O maior consumidor mundial de café é os Estados Unidos da América e, em segundo lugar está o Brasil. Países como

Alemanha, Itália, Japão, Bélgica, França e Espanha destacam-se também como grandes importadores e consumidores de café (ICO, 2012).

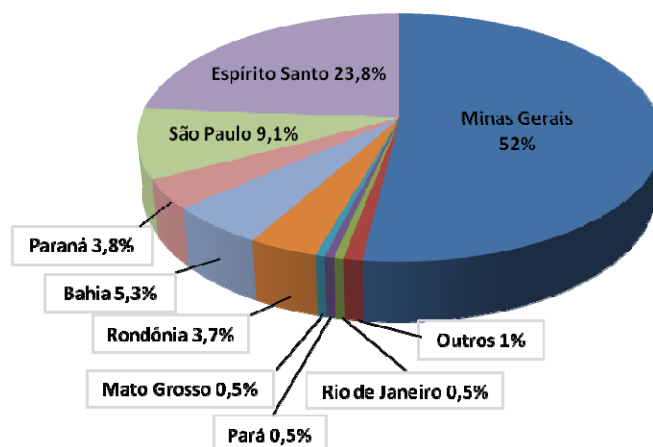


Figura 6 Produção de café - Safra de 2012: Participação percentual por Unidade da Federação (UF).

Fonte CONAB, 2012

Quanto à evolução do mercado interno brasileiro, o consumo de café continua em ascensão. No período compreendido entre Novembro/2010 e Outubro/2011, a Associação Brasileira de Indústrias de Café (ABIC, 2012) registrou o consumo de 19,72 milhões de sacas, isto representa um acréscimo de 3,11 % em relação ao período anterior correspondente (Nov/09 a Out/10) de 19,13 milhões de sacas (Figura 7).

O consumo per capita foi de 6,10 kg de café em grão cru ou 4,88 kg de café torrado (Nov/10 a Out/2011) quase 82 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 1,45 % em relação ao período anterior. Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida. A evolução dos últimos anos (Figura 7) é reflexo do aumento da qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores, são produtos diferenciados que muitas vezes trazem os símbolos de certificação de qualidade .

Ao lançar o Programa do Selo de Pureza, em 1989, a ABIC anunciou que pretendia reverter a queda no consumo de café que havia à época, por meio da oferta de melhor qualidade ao consumidor e desde seu lançamento o consumo é crescente. (ABIC, 2012). Para 2012, as expectativas da ABIC projetam um crescimento de 3,5 % em volume, o que elevaria o consumo para 20,41 milhões de sacas.

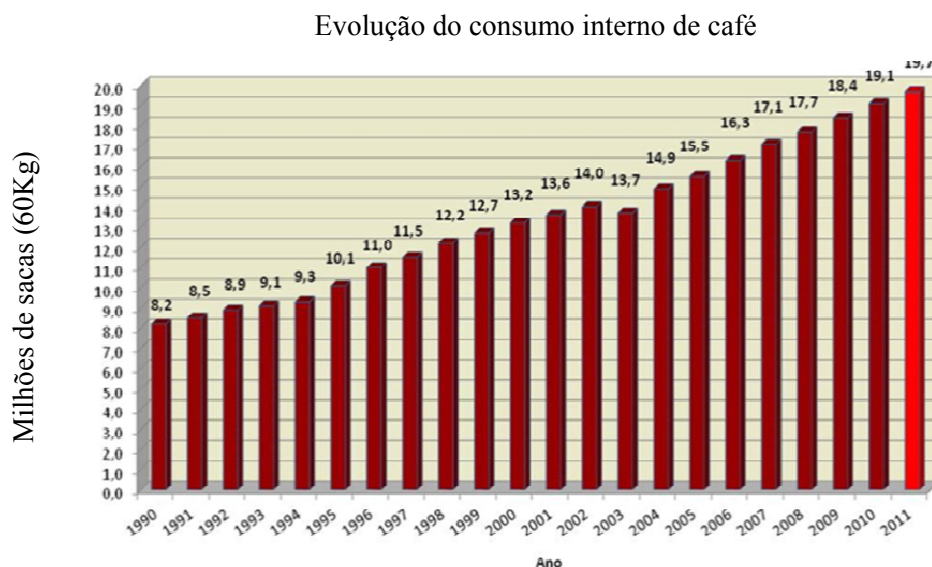


Figura 7 Evolução do consumo interno anual de café no Brasil em milhões de sacas.  
Fonte:ABIC, 2012.

### 2.2.3 Genômica do cafeeiro

*C. arabica* é uma espécie alotetraplóide ( $2n = 4x = 44$ ) originada a 1 milhão de anos a partir da hibridização natural de dois genomas ancestrais diplóides, *C. canephora* e *C. eugenoides* (LASHERMES et al., 1999) (Figura 5). O tamanho do seu genoma foi calculado em  $2,62 \times 10^9$  pb (CLARINDO e CARVALHO, 2011). A origem de *C. arabica*, a partir de duas espécies com

genomas muito parecidos, faz com que a meiose nessa espécie tetraplóide seja como uma meiose de espécie diplóide, apresentando um pareamento regular dos bivalentes cromossômicos (HERRERA et al., 2004). Devido à autopolinização de suas flores, a espécie é caracterizada por uma baixa diversidade genética (HATANAKA et al., 1999).

*C. canephora* é uma espécie diplóide ( $2n = 2x = 22$ ), possui alta variabilidade genética e capacidade de se adaptar às mais variadas condições climáticas (BERTRAND et al., 2003). Entretanto, produz um café de menor qualidade, mais adequado à produção de café solúvel (HATANAKA et al., 1999). O seu genoma foi calculado em  $1,41 \times 10^9$  pb, ou seja, cerca de 700MB por genoma haplóide (CLARINDO e CARVALHO, 2009).

Apesar das diferenças cromossômicas entre estas duas espécies comerciais de cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*) e espécies selvagens (*C. racemosa* e *C. liberica*) é possível a transferência de características de interesse entre elas (HERRERA et al., 2002). Assim, já foram introduzidas em *C. arabica* por meio de cruzamentos genes de resistência à ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), a nematoides (do gênero *Meloidogyne*) e ao fungo *Colletotrichum kahawae*, agente causador da antracnose dos frutos verdes “*Coffee Berry Disease*” – CBD (BERTRAND et al., 2003).

#### 2.2.4 Melhoramento genético de cafeeiro

No Brasil, a variedade de *C. canephora* mais plantada é o Conilon, devido a sua boa produtividade. O café Conilon também é muito utilizado como porta enxerto, devido a sua resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita*. Um exemplo desta prática agrícola é a utilização da variedade Apoatã de *C. canephora* (IAC2258) como porta enxerto de *C. arabica* sensível ao nematóide (FAZUOLI, 1981).

Algumas espécies selvagens e não cultivadas comercialmente como *C. racemosa* e *C. liberica* apresentam-se como fonte potencial de variabilidade genética e destacam-se por possuírem características altamente vantajosas como resistência à doenças e pragas, tolerância à seca e outras alterações ambientais (FAZUOLI et al., 1999). Um exemplo dessa importância é o uso de *C. racemosa* para a obtenção de novas variedades de *C. arabica* tolerantes ao bicho mineiro (GUERREIRO FILHO, 2006).

Assim, *C. arabica* é a única espécie alotetraplóide do gênero *Coffea* e predominantemente autofértil em aproximadamente 90 % das flores, enquanto que *C. canephora* e as outras espécies conhecidas deste gênero são diplóides e autoincompatíveis, multiplicando-se exclusivamente por fecundação cruzada (FAZUOLI et al., 1999).

A transferência de características de interesse agrônomo pode ocorrer entre *C. arabica* e *C. canephora* pela utilização dos acessos 832/1 e 832/2 do Híbrido de Timor (CARVALHO et al., 2008), caracterizadas no *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro* (CIFC, Portugal), híbridos naturais entre essas duas espécies. Esses híbridos foram extremamente valiosos para programas de melhoramento realizados na segunda metade do século XX em diversas partes do mundo (Brasil, Colômbia, Kênia, Costa Rica e Honduras) com o propósito de obter cultivares de *C. arabica* tolerantes à ferrugem (*Hemileia vastatrix*), ou a outras doenças e pragas do cafeeiro como nematóides (*Meloidogyne* sp.) e fungo (*C. kahawae*), por exemplo. Muitos cultivares de *C. arabica* derivados dos híbridos de Timor, tal como o Catimor (oriundo do cruzamento Caturra x HT), Costa rica 95 ou o Sarchimor (oriundo do cruzamento Villa Sarchi x HT), bem como, as cultivares Obatã e IAPAR 59 (I59), são muito utilizados nos programas de melhoramento para gerar novas variedades tolerantes à ferrugem (LASHERMES et al., 2000a).

A transferência de características de interesse por meio de cruzamentos clássicos está associada, muitas vezes, à transferência de genes indesejáveis que poderão influenciar a qualidade da bebida (BERTRAND et al., 2003). Por se tratar de uma cultura perene e de período juvenil longo, a fase reprodutiva de *C. arabica* ocorre uma vez ao ano, depois do segundo ano de plantio, o que faz com que a transferência de genes por meio de cruzamentos fique restrita a esse período. Assim, desde as primeiras hibridações até a obtenção de cultivares melhorados pode-se levar no mínimo 20 anos. Dois exemplos práticos desse processo funcional, porém delongado são as cultivares Obatã e Catuaí, cujo programa de melhoramento estendeu-se de 1968 a 2000 e de 1950 a 1992, respectivamente (BRANDALISE, 2007).

A redução dos custos de produtividade e o aumento da produção certamente são fatores que afetam diretamente o crescimento e potencial competitivo do país no que diz respeito ao melhoramento de cafeeiro. Desse modo, há necessidade da utilização e aperfeiçoamento de técnicas que permitam, em curto espaço de tempo, disponibilizar a obtenção, avaliação e seleção de materiais superiores, almejando-se ampliar de forma estratégica, a diversidade genética de cultivares de *C. arabica* considerada relativamente pequena.

Nesse contexto, A transgenia apresenta-se como uma ferramenta útil para o melhoramento genético do cafeeiro, uma vez que têm se destacado principalmente devido à possibilidade de obtenção de resultados direcionados para características agrícolas desejáveis. como, por exemplo, para o controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Esta é uma praga que ataca os grãos do cafeeiro causando decréscimo na qualidade e aroma dos grãos e conseqüentemente gera grandes prejuízos monetários para o mercado mundial (PAVA-RIPOLL et al., 2008). A transgenia pode ser utilizada como uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético do cafeeiro uma vez que não há dentre as espécies descritas do gênero *Coffea* nenhuma que seja naturalmente

resistente a essa praga (DAMON, 2000). O trabalho de Lashermes et al. (2008) destaca a utilização de marcadores moleculares como importante ferramenta para detecção de polimorfismos no DNA, oferecendo possibilidades para as análises genéticas em menor tempo.

A transgenia permite a introdução de um ou poucos genes de interesse em um genoma vegetal receptor independente de barreiras geográficas e incompatibilidades biológicas entre espécies. (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998) Uma vez que *C. arabica* é perene, autógama e tem baixa variabilidade genética, a transgenia apresenta-se como uma alternativa promissora para agregar características fenotípicas de interesse como resistência à patógenos, tolerância à seca ou a qualidade da bebida. Existem alguns protocolos estabelecidos de transformação de *C. canephora* (LEROY et al., 2000; CANCHE-MOO et al., 2006; RIBAS et al., 2006) e *C. arabica* (LEROY et al., 2000; ALPIZAR et al., 2006, 2008; BARBOSA et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2009).

Para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (PGM) com o fenótipo desejável, é fundamental o controle de expressão do transgene que assegure níveis adequados e somente nos tecidos desejados. Tal estratégia ameniza alguns questionamentos sobre biossegurança das PGM e minimiza gastos energéticos da planta com uma expressão direcionada. É um fator importante para tentar minimizar os efeitos indesejáveis da expressão constitutiva. em parte devido à expressão indiscriminada do transgene guiado por promotores tal como o 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S).

### 2.3 Regulação transcricional em eucariotos

A regulação da expressão gênica pode ocorrer em diferentes estádios e, pode ser particularmente importante durante a transcrição (Figura 8). Para a maioria dos genes que codificam proteínas, o início da transcrição inclui a ligação e ativação da RNA polimerase II.

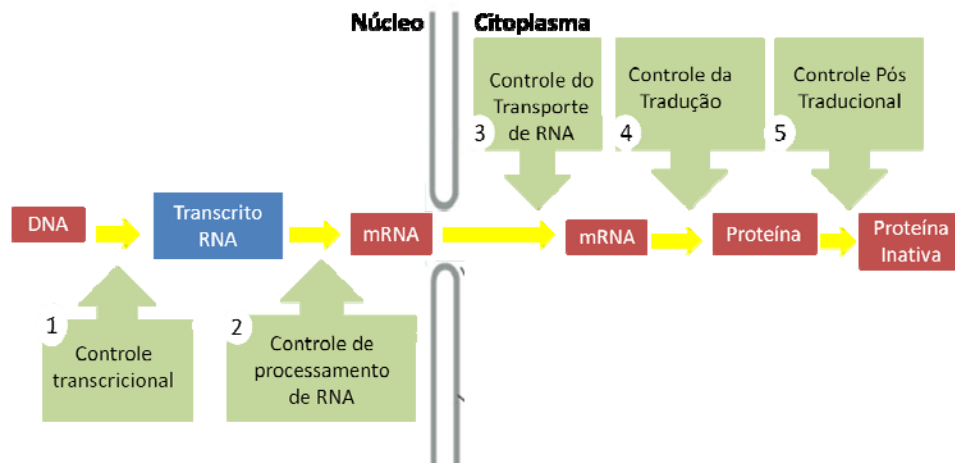


Figura 8 Pontos de controle da expressão gênica: (1) Controle transcricional; (2) Controle de processamento de RNA; (3) Controle do transporte de RNA; (4) Controle da tradução; (5) Controle pós traducional.

Fonte ALBERTS, 2002 (adaptado)

O processo de transcrição a nível basal é dependente de sequências encontradas no promotor mínimo (núcleo promotor ou promotor cerne) (Figura 9), onde estão os sítios de ligação para fatores de transcrição (FTs) e da RNA polimerase. Elementos *cis*, encontrados em regiões à montante do núcleo promotor, permitem a ligação de proteínas regulatórias ativadoras ou repressoras responsáveis por modular os níveis da transcrição. A junção de todos esses elementos compõe um conjunto de módulos importantes no controle do perfil de expressão global de um gene, direcionando ou prevenindo a transcrição temporal



e espacial apropriada. Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem por meio de uma intricada rede de interações envolvendo todos esses elementos.

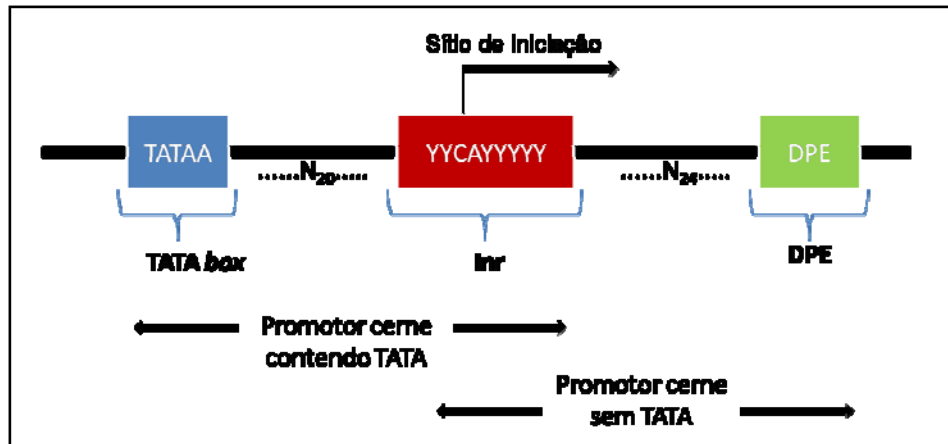


Figura 9 O promotor mínimo da RNA polimerase II pode apresentar um TATA box a aproximadamente 30pb a montante do sítio de iniciação (Inr). Os promotores sem TATA box podem apresentar o elemento promotor a jusante (DPE). O TATA box possui sequência consenso TATAA. O Inr possui bases pirimídicas (Y) ao redor de um núcleo conservado de CA (citosina e adenina). A sequência apresenta a fita codificadora.

Fonte LEWIN, 2009 (adaptada)

A região promotora de um gene eucarioto, em geral, possui sequências semiconservadas. Uma destas sequências denominada “TATA Box” (T/A)A(A/T)AAT encontra-se a aproximadamente 30 pb a montante do sítio de início da transcrição. Elementos promotores proximais também estão localizados cerca de 100 (“CCAAT Box”) e 200 pb (“GC Box”) a montante do ponto de início da transcrição. Os elementos contidos em tais sequências normalmente determinam o ponto correto de início da transcrição, bem como o local e o momento em que esse processo biológico deverá ocorrer.

Os elementos *cis* podem estar localizados a centenas ou milhares de pares de base de distância do gene que controlam. Eles podem ser encontrados à montante, à jusante, ou no interior da região codificadora, e mesmo em regiões de cromossomos estruturalmente adjacentes. Os elementos ativadores ou potencializadores são motivos de sequências curtas que contém locais de ligação para os FTs e ativam genes-alvo independente da orientação (KOLOVOS et al., 2012). Enquanto muitos dos elementos *cis* ativadores mostram-se necessários para a máxima ativação da transcrição de um gene, poucos elementos *cis* repressores, referidos como silenciadores, tem a capacidade de reprimir a expressão gênica (ALBERTS et al., 2002; LEWIN et al., 2009).

Promotores apresentam inúmeros sítios de ligação para fatores de transcrição específicos, que por sua vez são ativados sob diversos estímulos, tais como hormônios endógenos (auxinas, giberilinas, ácido salicílico, entre outros) e fatores exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura). Destacam-se entre os promotores usualmente empregados na produção de PGM o promotor CaMV 35S, os promotores dos genes que codificam respectivamente a nopalina sintetase (NOS) e octopina sintetase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (Ubi-1) de milho. Apesar dos avanços com o uso desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes submetidos à regulação dos mesmos são variados e, baixos em alguns casos (ZHENG e MURAI, 1997; GREEN et al., 2002), não havendo garantia de expressão no órgão/tecido adequado (NEUTEBOOM et al., 2002). O uso desses promotores ubíquos determina a expressão do produto gênico em todos os órgãos da planta, o que nem sempre é desejável.

A complexidade da transcrição envolve centenas de fatores, co-fatores, complexos de remodelação, elementos modificadores de histona e alongamento, *splicing* e fatores de terminação necessários ou associado a um único evento transcricional (CHAKALOVA e FRASER, 2010). De acordo com o tipo de

regulação da expressão gênica, os promotores usados na engenharia genética de plantas são tradicionalmente divididos em três categorias: (1) promotores constitutivos (ativos continuamente na maioria ou em todos os tecidos), (2) promotores espaço-temporais (desenvolvimento estágio-específico ou atividade tecido-específica) e (3) promotores induzíveis (regulados por sinais físicos ou químicos externos). A utilização de vários genes em uma única planta transgênica requer um certo número de diferentes promotores o que pode evitar o silenciamento de genes que ocorre em plantas transgênicas com múltiplas cópias do mesmo promotor (MOURRAIN et al., 2007). Para resolver esse problema, é necessário isolar promotores tecido-específicos ou induzíveis para controlar a expressão do gene-alvo (YE et al., 2012).

### **2.3.1 Promotores utilizados na regulação da transcrição**

O promotor mais usado para expressão constitutiva em PGM é o CaMV, derivados de vírus de planta cujo tamanho original completo do promotor 35S é -941 a + 9pb (ODELL et al., 1985). Os promotores derivados de vírus usados em sistemas de plantas são retirados do DNA genômico viral dupla fita, o qual usa a RNA polimerase nuclear hospedeira e parece não depender de qualquer produto gênico de ação *trans* viral. O promotor CaMV 35S pode dirigir altos níveis de expressão do transgene tanto em dicotiledôneas como monocotiledôneas (POTENZA et al., 2004).

Devido ao sucesso do promotor CaMV 35S, outros promotores virais foram isolados para o uso em construções gênicas. Muitos desses novos promotores derivados de vírus atuam de maneira similar do que o promotor CaMV 35S e direcionam alta expressão tanto em mono como dicotiledôneas. Entre eles incluem-se o promotor do vírus mosaico da nervura de mandioca (CsVMV) (LI et al., 2001), promotores do vírus da risca da banana australiana

(BSV) (SCHENK et al., 2001), promotor do vírus do mosaico mirabilis (MMV) (DEY e MAITI, 1999) e o promotor do vírus mosaico *figwort* (FMV) (SANGER et al., 1990; MAITI et al., 1997).

Existem algumas limitações para o uso de promotores de origem viral. Há uma percepção científica de risco para a saúde humana com o uso de transgênicos feitos com pedaço de genes de vírus (embora sejam vírus de plantas) (HODGSON, 2000; HULL et al., 2000). Além disso, outros autores demonstram a capacidade da célula de reconhecer essas sequências virais como estranhas e inativá-las (ELMAYAN e VAUCHERET, 1996). Essa inativação pode ocorrer por mecanismos que incluem a inativação por metilação dependente ou metilação independente do promotor e transgene (SCHEID et al., 2002), remodelagem da cromatina e excisão do DNA estranho (KUMPATLA et al., 1998) e pareamento ectópico ou homólogo quando múltiplas cópias do transgene integram o genoma (MEYER e SAEDLER, 1996). O silenciamento do transgene é algumas vezes imprevisível, mas quando ocorre, ele pode levar ao encerramento da atividade do gene exógeno em toda a planta ou afetar a atividade do promotor (KLOTI et al., 2002).

Promotores endógenos de plantas são usados regularmente direcionando altos níveis constitutivos da expressão de transgenes (DHANKHER et al., 2002). Alguns destes promotores constitutivos fortes são derivados dos genes ubiquitina e actina. Um dos promotores de ubiquitina mais usados para transformação de plantas é o promotor *ubiquitin1* de milho (pUbi). O promotor *Act2* foi caracterizado a partir da família gênica da actina de *Arabidopsis thaliana* para o uso em dicotiledôneas (AN et al., 1996) e o promotor do gene *actin1* de arroz têm sido manipulado para o uso em cereais (McELROY et al., 1991; ZHANG et al., 1991).

Entretanto, a expressão constitutiva de transgenes pode ser problemática por várias razões. Se um transgene específico é super expresso em um estágio do

desenvolvimento ou em tecidos onde ele não é normalmente expresso, isso pode ocasionar problemas no crescimento e desenvolvimento da planta e potencialmente, no meio ambiente (POTENZA et al., 2004). A expressão constitutiva para resistência à patógenos pode levar à diminuição do crescimento (BOWLING et al., 1994, 1997), ou suscetibilidade reforçada à outros patógenos (STUIVER e CUSTERS, 2001; BERROCAL-LOBO et al., 2002).

Promotores de planta ativos precisamente quando e onde os produtos dos transgenes são necessários seriam ideais para estratégias de produção de PGM visando reforçar a resistência a doenças. O mecanismo de defesa da planta pode ser controlado por vias de transdução de sinal, promotores induzíveis e por meio dos elementos reguladores *cis* correspondentes (LIU et al., 2010). Os avanços tecnológicos em genética de plantas integradas aos sistemas de biologia e bioinformática renderam uma infinidade dados biológicos novos e informações sobre o metabolismo das plantas (VENTER, 2007). Elementos reguladores que atuam em *cis* são conservados entre as espécies de plantas, permitindo que eles sejam utilizados para construir promotores induzíveis sintéticos em sistemas de expressão heterólogos. Este avanço proporcionou uma plataforma para manipulação da atividade transcricional através de engenharia de promotores sintético em resposta direta a determinados estímulos ambientais, fisiológicos e químicos.

Como descrito acima, a maioria das PGMs relatados na literatura foi obtida utilizando promotores constitutivos. No entanto, existem restrições econômicas, ambientais e de biossegurança relacionadas à expressão constitutiva de genes heterólogos. Além disso, como mostram os exemplos citados, pode haver divergência de expressão ao utilizar um mesmo promotor dentro do grupo das angiospermas, pois há muitas vezes diferenças no nível de expressão para mono e dicotiledôneas e, do mesmo modo, pode não haver garantia de que esses reguladores se comportem de maneira similar em plantas perenes e anuais.

### 2.3.2 Promotores preferencialmente expressos em frutos/sementes

A expressão preferencial de transgenes em determinados tecidos/órgãos é necessária e de grande interesse comercial. As sementes são órgãos de armazenamento das plantas que acumulam altos níveis de lipídeos e proteínas e, portanto, constituem alvos ideais para a expressão de proteínas recombinantes. Entre os principais esforços para controlar a expressão do transgene de forma específica em sementes, a identificação de promotores específicos e adequados surge como uma estratégia chave para aplicações comerciais para aumentar o conteúdo nutricional e o controle de pragas nesses órgãos e visa desenvolver estratégias moleculares para o meio ambiente, agricultura, pesquisa, indústria alimentícia e farmacológica. (POTENZA et al., 2004; ZAVALLO et al., 2010).

Muitos promotores específicos de sementes foram obtidos, a maioria derivados de sequências flanqueadoras 5' de genes de proteínas e lípidos armazenados nas sementes, como os promotores napin de *Brassica*, glutelina e prolaminas do arroz, oleosina 19 de *Perilla*, e HaFAD2-1 de girassol (CHANDRASEKHARAN et al 2003; QU e TAKAIWA 2004; CHUNG et al 2008; ZAVALLO et al., 2010).

Diversos promotores específicos de frutos e sementes de dicotiledôneas têm sido caracterizados. Exemplo disso é o promotor semente específico do gene *soyAPI* de soja, onde o estudo da expressão estável foi feita em *Arabidopsis thaliana* evidenciando que o promotor pode regular o gene da  $\beta$ -glucuronidase para sementes maduras em níveis muito maiores do que identificado em outros tecidos e exibe atividade similar ao promotor 35S em sementes maduras (ZHAO et al., 2012).

O promotor da fitohemaglutinina de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem sido extensivamente utilizado para o controle de pragas de sementes em ervilha (SCHROEDER 1995), feijão azuki (ISHIMOTO et al., 1996), grão de bico

(IGNACIMUTHU et al., 2006), feijão-de-corda (SOLLETI et al., 2008) e café (BARBOSA et al., 2010). Extensa análise *in vivo* mostrou que mais de 20 elementos “*cis*” estão presentes na região promotora do gene da  $\beta$ -faseolina do feijão (*Phaseolus vulgaris*) e são ligados por fatores de ação “*trans*” específicos de sementes (CHANDRASEKHARAN et al., 2003).

A expressão de transgenes direcionada para os frutos acontece por muitos promotores de genes relacionados com a maturação. Os promotores dos genes que codificam a 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACC), a ACC-oxidase e a poligalacturonase (PG) foram caracterizados a partir de maçã (ATKINSON et al., 1998) e tomate (DEIKMAN e FISCHER, 1988; MONTGOMERY et al., 1993; NICHOLASS et al., 1995).

O gene da imunoglobulina do algodão foi funcionalmente caracterizado em três plantas: algodão, *Arabidopsis* e fumo (SUNILKUMAR et al., 2002). Esse promotor dirige a expressão do gene repórter ao longo da maturação das sementes de forma temporalmente regulada e limita-se a estádios intermediários do desenvolvimento embrionário. Em algodão a expressão começou durante a fase de expansão dos cotilédones. No entanto, a atividade do promotor de globulina em fumo e *Arabidopsis* foi substancialmente menor, mostrando a necessidade do isolamento e aplicação de promotores tecido-específicos endógenos para a transformação dessas plantas.

A expressão gênica localizada pode também ser necessária para satisfazer regulações sobre segurança alimentar, tais como diminuir potenciais efeitos alérgicos que resultam em aumento do risco de saúde aos consumidores (TAYLOR e HEFLE, 2002). Para evitar a dispersão gênica pelo pólen, promotores que direcionam a expressão do transgene podem ser usados (DANIELL, 2002) diminuindo, assim, polêmicas ambientais.

Um motivo de preocupação relativo ao uso de PGM refere-se à expressão de proteínas tóxicas como as utilizadas para o controle de

determinados insetos pragas. Muitos trabalhos relatam a eficiente utilização da toxina *Bt* (de *Bacillus thuringiensis*) em plantas transgênicas no controle de pragas (SHU et al., 2000; LEROY et al., 2000, NESTER et al., 2002). Entretanto, tal aplicação pode fazer com que os insetos alvo adquiriram resistência quando mantidos sob constante pressão de seleção (MENG et al., 2004), o que normalmente acontece quando promotores constitutivos são utilizados para expressão das proteínas heterólogas. Adicionalmente, a presença da toxina em todas as partes da planta pode causar a insatisfação e até mesmo repulsão do produto pelo consumidor, no caso de PGMs consumidos *in natura*.

Promotores tecido/órgão-específico já vêm sendo isolados de diferentes espécies vegetais (PARK e KLOEPPER, 2000; SONG e GOODMAN., 2002) e até mesmo construídos sinteticamente para este fim (RUSHTON et al., 2002). Muitos trabalhos mostram que os motivos que conferem a expressão semente-específica residem na região proximal do promotor, frequentemente nos 500 pb a montante do sítio de início da transcrição (FAUTEUX e STRÖMVIK, 2009). A disponibilidade de promotores com padrões de expressão conhecidos e restritos a frutos ou sementes de café ainda é pequena (Tabela 2). A utilização de promotores endógenos preferencialmente expressos em frutos se mostra necessária visto que o cafeeiro possui a maturação não uniforme de frutos e a qualidade da bebida está diretamente relacionada com as proteínas expressas nas sementes.

### **2.3.3 Promotores de genes do cafeeiro**

Proteínas de armazenamento de sementes são expressas em níveis elevados e seus promotores tornaram-se alvo atraente para uso em PGMs. Ensaio de atividade GUS com o promotor do gene *CaCSPI*, responsável por codificar a proteína de armazenamento globulina 11S em sementes de *C.*



*arabica*, bem como de suas deleções 5', foram conduzidos em tabaco e revelaram a capacidade de forte regulação (alta expressão do gene), em comparação ao promotor constitutivo CaMV 35S, além da especificidade no endosperma das sementes (MARRACCINI et al., 1999).

Outros trabalhos também evidenciam o potencial competitivo de promotores tecido-específicos de cafeeiro na regulação de genes em comparação ao direcionamento de promotores constitutivos como o CaMV 35S, isto é, além do padrão de expressão do transgene ser especificamente no órgão de interesse, há altos níveis de expressão. Rosillo et al. (2003) (Tabela 2) compararam o pCaMV35S a dois promotores de cafeeiro ( $\alpha$  – tubulina e  $\alpha$  – arabicina) mostrando que todos os dois promotores resultaram em expressão transiente similar do gene *uidA* em cafeeiro.

Destacam-se ainda outros importantes promotores de cafeeiro obtidos por Marraccini et al. (2003) e Satyanarayana et al. (2005) que descrevem, respectivamente, a caracterização do promotor do gene da subunidade menor da ribulose 1,5-bis-fosfato carboxilase - Rubisco (CaRBCS1) e da N-metil transferase (NMT), ambos em tabaco (Tabela 2). O trabalho de Marraccini et al. (2003) destaca fatores de ação *cis* responsivos à luz (LRE para “*light responsive element*”) no promotor do gene *CaRBCS1* que se expressa especificamente nas folhas de *C. arabica*. Tal elemento é extremamente conservado em promotores de plantas superiores e apresenta relação direta no controle transcricional inclusive no café. Por sua vez, o grupo que isolou o promotor NMT (Satyanarayana et al., 2005) foi o primeiro a relatar a clonagem do promotor de um gene envolvido na via de biossíntese da cafeína e os autores mencionam o interesse na utilização do promotor isolado de *C. canephora*, visando o estudo dos mecanismos moleculares e bioquímicos capazes de regular a produção da cafeína, bem como para a possibilidade de silenciamento do gene que codifica a enzima NMT pela regulação transcricional.

Promotores de *C. canephora* que direcionam forte expressão dos genes que codificam a desidrina (CcDH2a) (HINNINGER et al., 2006) e a oleosina (CcOLE –1) (SIMKIN et al., 2006) em grãos em desenvolvimento destacam-se também pela relevância comercial. No primeiro trabalho, os autores destacam a importância do isolamento do promotor da desidrina, visto que, trata-se de um gene expresso nos estádios tardios de maturação da semente e está relacionado à proteção das plantas contra estresses ambientais, principalmente a desidratação, elevada salinidade e baixa temperatura. Por outro lado, o estudo realizado com a família gênica da oleosina pela análise de expressão quantitativa de cinco genes durante a germinação e desenvolvimento de grãos de café mostra dois diferentes padrões de expressão dos transcritos das cinco oleosinas quanto à intensidade e tempo.

Tabela 2 Promotores de genes do cafeeiro

Promotor	Produto Gênico	Órgão/Tecido	Referência
<i>CaCSP1</i>	Proteína de reserva 11S	Fruto/Semente	Marraccini et al., 1999
<i>NMT</i>	N-metiltransferase	Folha	Satyanarayana et al., 2005
<i>CcDH<sub>2</sub></i>	Dehidrina	Fruto/Semente	Hinniger et al., 2006
<i>CaRBCS1</i>	Rubisco-subunidade menor	Folha	Marraccini et al., 2011
<i>Arabicina</i>	Arabicina	Semente	Rosillo et al., 2003
<i>CcOLE1</i>	Oleosina	Fruto/Semente	Simkin et al., 2006;
<i>CcPAL1</i>	Fenilalanina amônia-liase	Ubíquo	US Patent 6441273
<i>CaIRL</i>	Isoflavona redutase	Folha	Brandalise et al., 2009
<i>Tubulina</i>	$\alpha$ -tubulina	Semente	Rosillo et al., 2003

Muitos destes trabalhos foram resultantes do sequenciamento de etiquetas de sequências expressas (ESTs para “*Expressed Sequences Tags*”), que permitirá ainda a busca de outros promotores que possuem potencial de uso para

direcionar a expressão tecido-específica em estádios determinados de desenvolvimento de plantas de cafeeiro.

## 2.4 Projeto Genoma do Cafeeiro

Com o avanço da biotecnologia, projetos para o sequenciamento do genoma estrutural e funcional vêm sendo realizados para algumas espécies de plantas, como por exemplo, os projetos genoma de *A. thaliana* (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000), cana-de-açúcar (GRIVET e ARRUDA, 2002), do cafeeiro (VIEIRA et al, 2006, MONDEGO et al., 2011), eucalipto (GRATTAPAGLIA, 2004), arroz (INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT, 2005) e soja (SHOEMAKER et al., 2002).

Uma alternativa simples e eficiente para identificar genes expressos (ou ESTs) em condições ambientais e tecido-temporais específicas é a produção de randômica de sequências a partir de transcritos gênicos. Elas são obtidas pelo sequenciamento de bibliotecas de cDNA formadas por clones os quais coletivamente representam a fração expressa do genoma, o transcritoma.

Essa estratégia de sequenciamento aleatório foi inicialmente utilizada na espécie modelo *A. thaliana*, em arroz e posteriormente para milho. Projetos mais específicos contribuíram com ESTs tecido-específicas como os que foram relatados para raiz em cabeleira de *Medicago truncatula*, botões florais de *Brassica campestris*, entre outros. Uma grande variedade de sequências EST de diversas espécies estão depositadas em bancos de dados públicos como o dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>). Atualmente, há aproximadamente 73,3 milhões de ESTs (dbEST release 170712, Julho 2012) na coleção pública do NCBI sendo os maiores conjuntos depositados de ESTs de planta das espécies

*Zea mays* (milho) e *A. thaliana* com 2.019.137 e 1.529.700 sequências, respectivamente.

O número de 254.546 sequências de ESTs para cafeeiro estão depositadas em domínio público, essencialmente de *C. arabica* (174.275), *C. canephora* (69.066) e *C. racemosa* (10.838). A maior parte foi produzida pelo Projeto Genoma Café Brasileiro que gerou, 130.792, 12.381 e 10.566 sequências de EST de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, respectivamente, montados em 33.000 unigenes (VIEIRA et al., 2006). O grupo de pesquisa CENICAFE, por sua vez, produziu 32.961 sequências de EST de três tecidos diferentes (folhas, frutos com 31 semanas após a antese e flores) de *C. arabica* (cv. Caturra) montadas em 10.799 unigenes (MONTROYA et al., 2006). Apesar da obtenção dessas sequências em 2006, nenhum desses grupos de pesquisa as tornou imediatamente públicas.

Outros grupos têm produzido conjuntos de sequências EST especialmente em *C. canephora*. Na França, o grupo do IRD (*Institut de Recherche pour le Développement*) produziu 10.420 sequências de ESTs (agrupadas em 5.534 unigenes potenciais) a partir das bibliotecas de cDNA de frutos e folhas (PONCET et al., 2006) que unidas às 47.000 sequências de EST disponíveis, representando 13.175 unigenes, publicados pela Nestlé e a universidade de Cornell (LIN et al., 2005), perfazem o total de 55.694 sequências tornaram-se disponíveis e formam uma das principais fontes de pesquisa para a comunidade científica.

Novas possibilidades de sequenciamento têm mudado a visão sobre a genômica no início do século XXI e tornando crucial para o café, por exemplo, plantas modelo como o tomate. O Projeto Genoma das SOLanaceae escolheu uma estratégia baseada no sequenciamento de 220Mb de eucromatina que contém a maioria dos genes e, particularmente os envolvidos em características

como a formação de frutos (KOCHKO et al., 2010) que são muito úteis para o estudo em café.

Atualmente, a montagem de ESTs de *C. arabica* e *C. canephora* produzida pela parceria entre o Projeto Genoma Café Brasileiro e o consórcio feito pela universidade de Cornell e a Nestlé revelaram mais de 32.000 clusters de *C. arabica* e 16.665 clusters de *C. canephora* (MONDEGO et al., 2011). A disponibilidade dessas sequências pode ser utilizada para diversos fins, como para a detecção dos perfis de expressão entre as principais espécies comerciais de cafeeiro no que diz respeito à estrutura genômica, ou alternativamente, visando encontrar genes similares em outras espécies. Além disso, é possível a realização de análises de ontologia gênica e domínios protéicos que permitem evidenciar diferenças entre as espécies de cafeeiro relacionadas com a síntese de açúcares complexos, proteínas, dentre outros. Os dados da expressão das sequências dos contigs de cada um dos grupos (*C. arabica* e *C. canephora*) pode ser explorada e comparada com os dados extraídos das bibliotecas de EST resultando na identificação de genes diferencialmente expressos e relacionados à defesa da planta, estresses abióticos e à qualidade da bebida, por exemplo (MONDEGO et al., 2011). Desse modo, os ESTs fornecem importante fonte para a descoberta de novos genes e para análises comparativas entre organismos.

## OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar o gene candidato *CaLTP* que codifica uma proteína de transferência de lipídeos (nsLTP) no cafeeiro: isolar ortólogos de *Coffea*, homoeólogos de *Coffea arabica*, analisar a expressão durante o desenvolvimento do fruto e analisar a regulação da região promotora em plantas de tabaco transgênicas.

### Objetivos específicos

1. Identificar *in silico* contig candidato a alta expressão específica em frutos de café nos estádios iniciais do desenvolvimento\*;
2. Validar o gene candidato como órgão-específico por RT-qPCR e *Northern Blot*\*;
3. Analisar *in silico* e *in vivo* os órtologos de *Coffea* e os homoeólogos de *C. arabica* do gene *CaLTP*\*;
4. Caracterizar o perfil de expressão dos alelos do gene *CaLTP* durante o desenvolvimento do fruto de *C. arabica* por RT-qPCR e *Northern Blot*\*;
5. Avaliar o perfil de expressão dos alelos do gene *CaLTP* em meristemas apicais dos ramos plagiotrópicos de plantas submetidas ao estresse hídrico e plantas controle de *C. arabica* por RT-qPCR;
6. Isolar o promotor do gene *CaLTP*;
7. Amplificar fragmentos promotores que representem deleções 5' do promotor isolado;
8. Identificar os principais domínios presentes em cada uma das sequências promotoras por análises *in silico* em bancos de dados de sequências regulatórias;
9. Construir vetores de expressão contendo os promotores putativos justapostos à região codificadora do gene repórter *uidA*.
10. Obter plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* e testá-las quanto à expressão do gene repórter *uidA* sob o comando dos promotores isolados por ensaios histoquímicos;
11. Avaliar a funcionalidade dos promotores através do monitoramento da atividade GUS em plantas transformadas de tabaco por ensaios fluorimétricos;

\*\*As etapas 1, 2, 3 e 4 foram iniciadas durante estágio de iniciação científica da aluna e os resultados conclusivos foram obtidos durante o mestrado.

12. Avaliar o número de transgenes inseridos por análise da segregação da tolerância a canamicina em plantas T1 pelo uso do teste estatístico de  $\chi^2$

\*\*As etapas 1, 2, 3 e 4 foram iniciadas durante estágio de iniciação científica da aluna e os resultados conclusivos foram obtidos durante o mestrado.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação *in silico* de gene fruto-específico no Banco de ESTs do Projeto Genoma Café (cafEST)

Bibliotecas de ESTs (*expressed sequences tags*) de cafeeiro das espécies *C. arabica* (cv. Mundo novo e cv. Catuaí), *C. canephora* e *C. racemosa*, disponíveis no Banco de ESTs do Projeto Genoma Café Brasileiro (<http://www.cenargen.embrapa.br/biotec/genomacafe>) (VIEIRA et al. 2006) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram submetidas à *Northern* eletrônico (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>) utilizando o Teste Exato de Fisher para restringir os resultados estatisticamente significantes ( $P \leq 5$ ) ao identificar ESTs específicas e representativas. Um grupo de bibliotecas de ESTs de fruto nos estádios iniciais do desenvolvimento (A) foi contrastado contra o grupo (B) formado por outras bibliotecas do banco (Tabela 3). As bibliotecas com as sequências de cDNA provenientes de tecidos não diferenciados e de plântulas não foram inseridas em nenhum dos grupos.

Os perfis de expressão gerados *in silico* permitiram a seleção de *contigs* candidatos. As sequências nucleotídicas candidatas foram comparadas quanto à similaridade local no Banco de Dados de proteínas do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - ALTSCHUL et al., 1990) e ao banco nacional de patentes do INPI ([www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)) para a seleção de um Unigene candidato.

Tabela 3 Relação das bibliotecas geradas pelo projeto Genoma Café (modificado de VIERA et al., 2006) que foram contrastadas (grupos A e B) pela análise de *Northern* eletrônico.

Grupos	Bibliotecas	Características	Números de <i>reads</i> válidos
A	FV2	Frutos estádios 1, 2 e 3 ( <i>Coffea racemosa</i> )	7195
B	AR1, LP1	Plântulas e folhas tratadas com ácido araquidônico	5664
	BP1	Suspensão celular tratada com acibenzolar-S-methyl	12379
	CB1	Suspensão celular tratada com acibenzolar-S-methyl e brassinosteróides	10311
	CL2	Hipocótilos tratados com acibenzolar-S-methyl	11615
	CS1	Suspensão celular tratada com NaCl	10803
	EA1, IA1, IA2	Calos embriogênicos	9191
	EB1	Embrião zigótico (fruto imaturo)	192
	EC1	Calos embriogênicos de <i>Coffea canephora</i>	8050
	EM1, SI3	Sementes em germinação	9201
	FB1, FB2, FB4	Botão floral em diferentes estádios de desenvolvimento	23036
	FR1, FR2	Botão floral + chumbinho + frutos em diferentes estádios de maturação	14779
	FR4	Frutos ( <i>Coffea racemosa</i> )	7967
	CA1, IC1, PC1	Calo não embriogênico com e sem 2,4 D	12135
	LV4, LV5	Folhas jovens dos ramos plagiotrópicos	15067
	LV8, LV9	Folhas adultas dos ramos plagiotrópicos	11864
	NS1	Raízes infectadas com nematoides	569
	PA1	Calo embriogênico primário	2483
	RM1	Folhas infectadas com bicho-mineiro e ferrugem	5567
	RT3	Raízes	560
	RT5	Raízes com acibenzolar-S-methyl	2311
	RT8	Células em suspensão estressadas com alumínio	9119
	RX1	Ramos infectados com <i>Xylella spp.</i>	9563
	SH1	Folhas de plantas em estresse hídrico ( <i>Coffea canephora</i> )	368
	SH2	Plantas em estresse hídrico (vários tecidos)	682

A sequência do contig candidato escolhido (18885) foi utilizada para identificar sequências nucleotídicas similares em Bancos de Dados públicos como do Sol Genomics Network (SGN, <http://solgenomics.net/content/coffee.pl>; MUELLER et al., 2005); HarvEST (<http://harvest.ucr.edu/>; LIN et al., 2005) e Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>; VIEIRA et al.,

2006; MONDEGO et al., 2011). Alinhamentos múltiplos de sequências de nucleotídeos e proteínas foram feitas pelo programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) seguido por ajuste manual. O programa TargetP (EMANUELSSON et al., 2007) foi usado para identificar peptídeos sinais potenciais nas sequências obtidas. A predição da estrutura tridimensional foi feita no banco de dados Phyre2 (KELLEY e STERNBERG, 2009; WASS et al., 2010).

### 3.2 Desenho dos iniciadores (*primers*)

Diferentes pares de *primers* foram desenhados (Tabela 4) visando (i) sintetizar a sonda dos experimentos de *Northern blot*, (ii) isolar os cDNAs e genes homoeólogos e ortólogos de *CaLTP*; (iii) analisar a expressão dos alelos de *CaLTP* por RT-qPCR, (iv) isolar diferentes fragmentos da região promotora do gene *CaLTP* e (v) sequenciamento. A sequência do contig 18885 foi utilizada para o desenho dos *primers* no programa *primer 3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) - ROZEN e SKALETISKY, 2000). Parâmetros específicos, tais como tamanho dos *primers* e amplicons, foram utilizados para o desenho dos *primers* de acordo com a finalidade de cada experimento. Todos os *primers* foram desenhados em regiões com 40 a 60 % dos nucleotídeos citosina (C) e guanina (G) em sua sequência e temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) entre 57 °C e 63 °C. Dois *primers* gene-específicos, GSP1 e GSP2, foram utilizados para isolar a região promotora pelo método 5'RACE e para isso foram desenhados de acordo com os parâmetros exigidos pelo fabricante do kit Genome Walker (Clontech). Estes *primers* reversos foram desenhados dispostos em sequência, na região mais próxima possível da região 5' do contig 18885. Após amplificar os fragmentos promotores oriundos das quatro bibliotecas do kit, os amplicons foram clonados

e sequenciados e as quatro sequências foram montadas em um contig cuja sequência foi utilizada para o desenho de novos *primers* com objetivo de amplificar regiões específicas do promotor.

Tabela 4. Lista dos *primers* utilizados durante os experimentos de *Northern blot* (i), PCR (ii), RT-qPCR (iii), para isolar os diferentes fragmentos da região promotora (iv) e sequenciamento (v). As letras minúsculas sobrescritas entre parênteses representam as combinações dos pares de *primers* utilizados. F: Forward, R: Reverse. 1AM, 2AM, 3AM e 4AM: Diferentes fragmentos promotores gerados por amplificação nas bibliotecas utilizando o kit Genome Walker.

	<i>Primers</i>	Sequência (5'>3') dos <i>primers</i>	Tamanho dos amplicons
(i)	<sup>(a)</sup> LTP-F3	ACGACTAGTGAAATCATCTGGGGTTGCAC	352
	<sup>(a)</sup> LTP-F4	GACTACTAGCGGCCGCTTCTCGTTCAACACCATTAC	
(ii)	<sup>(b)</sup> CgLTPF1	GCGCTTTTGGCTTTTCATAAAGAT	-
	<sup>(c)</sup> CgLTPF2	GCACTTTTGGCTTTTCATAATGATG	-
(iii)	<sup>(d)</sup> LTP1FT	CTGTGGTCTGAAATGGCCAAC	-
	<sup>(b,c,d)</sup> LTP1R1	GCTCGAAAAC TAGTAATGGTGTGAAT	<sup>(b)</sup> 401 <sup>(c)</sup> 400 <sup>(d)</sup> 113
	<sup>(b,c,d)</sup> LTP1R2	GCAACGTTCCCATGTAATGGTG	<sup>(b)</sup> 407 <sup>(c)</sup> 408 <sup>(d)</sup> 120
	<sup>(f)</sup> Nubi F	AAGACAGCTTCAACAGAGTACAGCAT	120
	<sup>(f)</sup> Nubi R	GGCAGGACCTTGGCTGACTATA	-
(iv)	<sup>(g)</sup> GSP1	CAGATCCACCAGCAACAGTACAACC	-
	<sup>(h,i,j,k)</sup> GSP2	CAGTGCAACCCCAGATGATTTCTTC	-
	<sup>(g)</sup> AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
	<sup>(h)</sup> AP2 <sub>2AM</sub>	ACTATAGGGCACGCGTGGT	850
	<sup>(i)</sup> AP2 <sub>3AM</sub>	ACTATAGGGCACGCGTGGT	950
	<sup>(j)</sup> AP2 <sub>1AM</sub>	ACTATAGGGCACGCGTGGT	1300
	<sup>(k)</sup> AP2 <sub>4AM</sub>	ACTATAGGGCACGCGTGGT	1900
	<sup>(l)</sup> F1pBI	CGCAAGCTTCATCCTAAAATACATTCTG	1.253
	<sup>(m)</sup> F2pBI	CGCAAGCTTTCCATGAAAAATGCAATCC	1.048
	<sup>(n)</sup> F3pBI	CGCAAGCTTCCAAGACATTATTAATGATC	828
	<sup>(o)</sup> F4pBI	CGCAAGCTTCTCCCACTTCTCAAACTTGG	451
	<sup>(l,m,n,o)</sup> R1pBI	CGCGGATCCGAAAAGCAAAAAGTGCAGAAGAG	-
(v)	M13 F	CAGGAAACAGCTATGAC	-
	M13 R	GTAAAACGACGGCCAG	-
	PBIR	GCTTCCCACCAACGCTGATCAAT	-

### 3.3 Material Vegetal

Folhas de *C. arabica* (var Catuaí Amarelo e Mundo Novo) e de *C. canephora* (clone 120) foram coletados de uma planta cultivada no pátio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e de plantas do campo experimental da Embrapa Cerrados, ambas unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Meristemas apicais de ramos plagiotrópicos de plantas de *C. arabica* var Rubi e var IAPAR 59 com 4 anos de idade foram coletados em 2011 no regime RH0 (plantas sob déficit hídrico) e RH4 (plantas irrigadas) no campo experimental da Embrapa Cerrados. Sementes de *C. arabica* variedade Catuaí Amarelo cedidas pelo Funprocafé (Varginha-MG) foram germinadas em papel germiteste, transferidas para substrato vegetal (vermiculita - Terral) e cultivadas em casa de vegetação com temperatura e fotoperíodo naturais durante 190 dias quando as raízes foram coletadas. Frutos de *C. arabica* var IAPAR 59 foram coletados (entre 14 e 15 h) de plantas cultivadas na Embrapa Cerrados e durante duas safras (2006/2007 e 2008/2009). Essas colheitas foram feitas regularmente ao longo da maturação do fruto, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias após a floração (DAF). Os frutos coletados durante a safra 2006/2007 foram dissecados nos tecidos pericarpo, perisperma e endosperma. Por outro lado, os frutos coletados durante a safra 2008/2009 foram utilizados inteiros nos experimentos.

Sementes de tabaco variedade Xanthi foram germinadas e cultivadas em casa de vegetação para que folhas jovens de plantas com 60 dias fossem coletadas. Os materiais vegetais de cafeeiro e tabaco coletados foram imediatamente resfriados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer -80 °C.

### 3.4 Extração de DNA

Os DNAs genômicos de folhas *C. arabica* (var Catuaí Amarelo e Mundo Novo) e de *C. canephora* (clone 120) foram extraídos pelo método de Doyle e Doyle (1987) modificado como descrito a seguir. Uma vez pulverizado em nitrogênio líquido, o pó macerado de 2,5 g de folhas jovens foi transferido para tubo falcon onde adicionou-se 20 mL de tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM; CTAB 2 %; EDTA 0,05 M; PVP 1 %;  $\beta$ -mercaptoetanol 1 %) pré-aquecido a 65 °C. As amostras foram incubadas a essa temperatura por uma h. Em seguida, foi adicionado um volume da mistura de fenol ácido (pH 8): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram agitados por inversão manual por 15 min. O material foi centrifugado por 10 min a 6869 x g, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo contendo um volume da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e tratada novamente nas mesmas condições. Após a centrifugação, a fase superior foi coletada e adicionada a um volume de isopropanol, misturada por inversão lentamente e centrifugada (30 min, 6869 x g). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 mL de etanol 70 % ao sedimento. Após centrifugar (5 min, 13.200 rpm), o etanol 70 % foi descartado por inversão do tubo e o sedimento foi seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em água bidestilada autoclavada e incubado com 2  $\mu$ L de RNase A (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) por 30 min a 37 °C. Após esta etapa foi feita a quantificação do DNA e a determinação de pureza por espectrofotometria (NanoDrop DN-1000) pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm.

### 3.5 Extração de RNA

Os frutos de *C. arabica* variedade I59 das safras 2006/2007 e 2008/2009 foram usados para os experimentos de validação e caracterização do gene *CaLTP in vivo*. O RNA total destes materiais foi extraído segundo dois diferentes protocolos. Os frutos da safra 2006/2007 foram dissecados para separar os tecidos pericarpo, perisperma e endosperma e o RNA foi extraído desses tecidos de forma independente utilizando o reagente Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Para os frutos da safra 2008/2009, os RNAs totais foram extraídos de frutos inteiros de *C. arabica* pelo protocolo adaptado de Jones et al. (1985). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para uma solução contendo 9 mL de tampão de extração (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M; EDTA 0,5 M pH 8; SDS 1 %; H<sub>2</sub>O DEPC 0,1 %) e 6 mL de fenol pH 8: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram agitados por 15 min e centrifugados (10 min) a 10733 x g. A fase aquosa foi transferida para novos tubos nos quais foram adicionados 1/10 do volume do sobrenadante de NaAc 3M pH 4,5 e dois volumes de etanol absoluto. Após uma precipitação (2 h, -20 °C), as amostras foram centrifugadas (10733 x g, 10 min) e o precipitado dissolvido em 2,5 mL de água estéril tratada com DEPC 0,1 %. A precipitação do RNA foi feita com LiCl 4M a 4 °C por aproximadamente 15 h. Em seguida, o material foi centrifugado (10733 x g, 15 min) o sedimento foi lavado com etanol 70 % e ressuspendido em 200 µL de água tratada com DEPC 0,1 %. Todas as soluções, exceto Tris e solventes orgânicos, foram tratadas com DEPC 0,1 %. Os RNA totais de raízes e folhas de *C. arabica* var Catuaí Amarelo foram extraídos usando o mesmo protocolo utilizado para os frutos de *C. arabica* var I59 (Safra 2008/2009). As análises de pureza, quantificação e integridade dos RNAs obtidos pelos dois protocolos



foram feitas por espectrofotometria (NanoDrop DN-1000) e eletroforese em gel de agarose 1,5 % em condições desnaturantes.

### 3.6 Northern blot

O RNA total (20 µg) de raiz, folha e fruto de *C. arabica* foi ressuspendido em tampão de amostra (Ficol 30 % (v/v); EDTA 0,5 M pH 8; azul de bromofenol 0,025 %; formamida 30,1 %; glicerol 2 % e brometo de etídio 0,1 %), fracionamento em gel de agarose 1,5 % em condições desnaturantes com tampão MOPS (MOPS 0,2 M; AcNa 50 mM; EDTA 10 mM) e transferido à vácuo (Vaccum blotter, BioRad) para uma membrana de nylon (Hybond N, Amersham Bioscience). A transferência foi realizada durante 3 h à pressão de 5 mm Hg em tampão de transferência SSPE 10X (NaCl 1,5M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M; Na<sub>2</sub>.EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mM). Após a transferência, a membrana foi incubada por 5 min em SSPE 2X e os RNAs foram fixados à membrana por exposição à luz UV (UV Stratalinker 1800, Stratagene) durante 30 s.

A sonda do *Northern blot* foi obtida por PCR com *primers* específicos (LTP-F3 e LTP-F4) cujo fragmento amplificado apresenta 352pb (Tabela 4). Reações contendo 2 µL de cada *primer* (40 pM cada), 5 µL do tampão de reação 10X (Gibco), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1µL de dNTP 10 mM, 2 µL do DNA molde (o unigene candidato, clonado no plasmídeo pSPORT I) na concentração de 40 ng, 0,4 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5U.µL<sup>-1</sup>) (Gibco) e água (qsp 50 µL) foram submetidas às (termociclador PTC-100, MJ Research) seguintes etapas: 2 min a 96 °C, seguidos por 30 ciclos de 30 seg à 94 °C, 30 seg a 50 °C e 1 min a 72 °C seguindo um ciclo de amplificação final (72 °C, 5 min). As reações foram mantidas a 4 °C e analisadas em gel de agarose 1,5 % com marcadores de peso molecular (1 Kb DNA Ladder - Gibco e pBR322 digerido com *Hinf*I).

O amplicon (50 ng) foi purificado do gel utilizando o “kit” Wizard®SV Gel and Clean Up System (Promega), desnaturado por cinco min a 95 °C, incubado no gelo durante 5 min e adicionado ao kit de marcação Ready to Go (Amersham Bioscience) junto com 5 µL de dCTP  $\alpha$ -P<sup>32</sup>(50 µCi), conforme especificações do fabricante. Depois de incubada a 37 °C por 40 min a sonda foi desnaturada (95 °C, 5 min) e imediatamente colocada a 4 °C por 10 min. A hibridização (12 h, 65 °C) foi realizada pela adição da membrana contendo o RNA previamente pré-hibridizado (2 h., 65 °C) em solução bloqueadora: SSPE 5x, Denhart 5x, SDS 0,5 % e esperma de salmão 20µg.mL<sup>-1</sup> (SAMBROOK et al., 1989) por 12 h a 65 °C. Após a hibridização, foram realizadas duas lavagens (15 min, temperatura ambiente) com solução SSPE 2X 0,1 % SDS, seguidas de duas lavagens (10 min, 65 °C) com solução SSPE 1X -SDS 0,1 % e de uma lavagem (10 min, 65 °C) com solução de SSPE 0,1X SDS 0,1 % (p/v). Após as lavagens, a membrana foi exposta ao Imaging Plate (IP BAS – SR 2040) por quatro h e a radioatividade imobilizada na membrana foi capturada e fotodocumentada pelo equipamento FLA 3000 (Fujifilm) contendo os programas apropriados.

### 3.7 RT-qPCR

Amostras de RNA total (5 µg) extraídos de raízes, folhas e frutos de *C.arabica* foram submetidos à tratamento enzimático com a DNaseI-RNase “free” (Promega), conforme recomendações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada com 1 µg de cada amostra que foi tratada com a enzima ImpromII (Promega), conforme recomendações do fabricante. O cDNA (fita simples) foi diluído (de 1/20 até 1/50) e amplificado por RT-qPCR usando pares de *primers* específicos (Tabela 4) do gene *CaLTP* (LTP1FT, LTP1R1, LTP1R2;) e do gene Ubiquitina (Nubi F e Nubi R) que foi utilizado como gene

de referência para a normalização das amostras (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009; CRUZ et al., 2009). As reações de RT-qPCR foram realizadas com 1 µL de cDNA em um volume final de 10 µL (termociclador 7500 FAST Real Time System, Applied Biosystem). O fluoróforo SYBRGreen (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen) foi utilizado conforme recomendações do fabricante. Para cada par de *primers*, foram verificadas as eficiências de amplificação em testes preliminares. O cálculo de quantificação relativa foi feito pelo método Ct calculado pela fórmula  $(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$  onde E representa a eficiência dos *primers* (BUSTIN, 2002, RAMAKERS, 2003). As análises de quantificação relativa seguiram os mesmos parâmetros de ciclagem e coleta de dados das amostras – 2 min a 50 °C, 5 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de amplificação de 3 s a 95 °C, 30 s a 60 °C - utilizados para gerar a curva de eficiência de amplificação. Os resultados foram analisados pelo programa Sequence Detection (Applied Biosystems).

### 3.8 Isolamento dos cDNAs e genes homoeólogos e ortólogos de *CaLTP*

RNA total de frutos inteiros de *C. arabica* var I59 (Safrá 2008/2009), com 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 DAF foram extraídos segundo o protocolo adaptado de Jones et al., 1985 (descrito no item 3.5). Amostras do RNA total (3µg) de cada estágio do desenvolvimento dos frutos foram misturadas em um tubo para que o ciclo completo de maturação dos frutos estivesse representado igualmente em uma única amostra. Tratamento com DNase, por meio do protocolo descrito no kit DNase I Amplification grade da Invitrogen, foi realizado ao adicionar 6,17 µL (10 µg) da mistura dos RNAs à 2 µL de tampão 10X, 10 µL de DNase I e 1,83 µL de água DEPC 0,1 %. A reação foi preparada para o volume final de 20 µL. A amostra foi colocada por 15 min a 25 °C e, em seguida foi resfriada no gelo quando EDTA 25 mM foi adicionado (10 µL). A

amostra foi colocada a 65 °C por 10 min no gelo. Após o tratamento com DNase, as análises de pureza, quantificação e integridade da amostra de RNA foi feita por espectrofotometria (NanoDrop DN-1000).

O RNA total tratado na concentração de 2 µg foi adicionado à reação de RT-PCR, segundo protocolo da Super Script III <sup>TM</sup>Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para isso, 6,89 µL de RNA tratado foi adicionado à 1 µL dNTPs 10 mM, 2 µL de oligo (dT) 1:10 e água estéril no volume de 3,11 µL. A reação foi colocada em termociclador por 5 min a 65 °C e em seguida imersa no gelo. Posteriormente, a amostra foi misturada, adicionada à reação subsequente com 4 µL de tampão, 1 µL de DTT, 1 µL de SuperScript III RT (200u/ µL) e incubada a 50 °C por 1 h, 70 °C por 15 min e 4 °C para finalizar a reação. O cDNA (5µL) obtido foi adicionado ao gel de agarose 0,8 % com 2 µL de marcador 1Kb DNA ladder plus (200ng).

As reações de PCR utilizando como molde o cDNA dos frutos de *C. arabica* var I59, o DNA genômico de *C. arabica* var Mundo Novo e *C. canephora* (Clone 120) foram feitas usando as mesmas combinações de *primers* (i) CgLTPF1 e LTP1R1; (ii) CgLTPF1 e LTP1R2 (iii) CgLTPF2 e LTP1R1 e (iv) CgLTPF2 e LTP1R2 (Tabela 4) e as mesmas condições de termociclagem: 94 °C por 3 min, 35 ciclos de: 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s; 72 °C por 10 min e 4 °C, para finalizar a reação. A diluição das amostras foi padronizada em 1:10 para o cDNA e 1:20 para o DNA genômico. As reações de PCR para uma reação com 5 µL de cDNA ou DNA genômico contiveram 2,5 µL de PCR Buffer 10X (-Mg), 0,5 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,25 µL de cada *primer* (10 µM), 0,3 µL de Taq DNA Polimerase (5U.µL<sup>-1</sup>) (Invitrogen) e 13,2 µL de água estéril para completar o volume final de reação.

Os fragmentos amplificados por PCR foram visualizados em gel de agarose e purificados pelo uso do kit Wizard®SV Gel and Clean Up System

(Promega) segundo as instruções do fabricante. Os fragmentos foram clonados como especificado no tópico 3.10 e dois clones de cada evento de transformação foram sequenciados como descrito no tópico 3.12 para análises posteriores.

### 3.9 Isolamento do promotor de *CaLTP3*

O promotor do gene *CaLTP* foi isolado pela metodologia 5' RACE, com a utilização do Kit Universal Genome Walker (GW) (Clontech) de acordo com as especificações do fabricante (Figura 10).

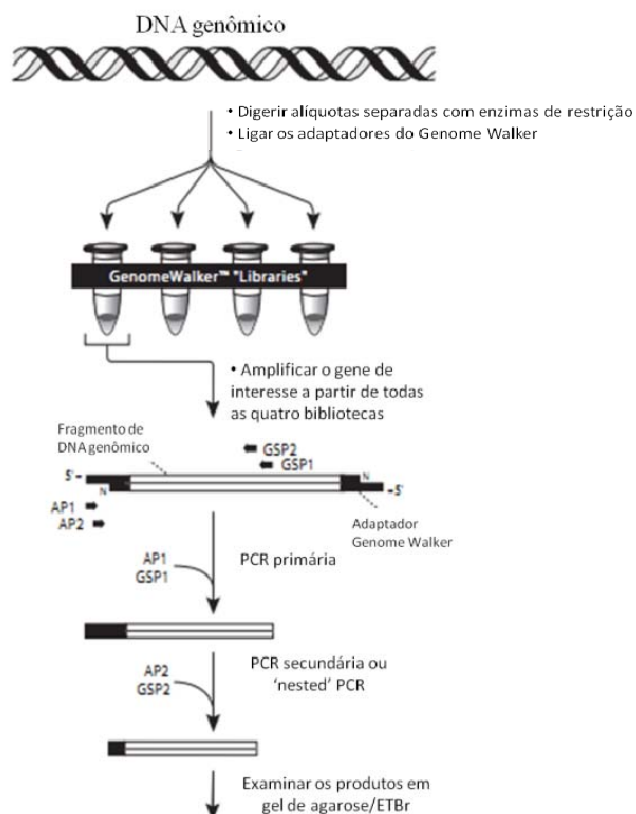


Figura 10 Metodologia Genome Walker  
Fonte Genome Walker™ Universal kit, 2007.

Foram sintetizados dois *primers* reversos, GSP1 e GPS2 (Tabela 4), a partir da sequência de referência do contig 18885 (anexo). Os *primers* GSPs foram desenhados e posicionados em sequência próxima da região 5' do contig.

Para a construção das quatro bibliotecas do GW, alíquotas de DNA genômico (DNAg) de folhas de *C. arabica* var Catuaí Amarelo (isoladas de acordo com o item 3.4) foram digeridas independentemente com as enzimas de restrição de corte abrupto *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, durante 18 h. Uma vez digeridos, os fragmentos foram ligados a adaptadores contendo os sítios para fixação dos *primers* AP1/AP2 (Tabela 4) fornecidos no kit Genome Walker. As bibliotecas de DNA genômico assim geradas foram submetidas à amplificação por PCR com os *primers* específicos GSP1/GPS2 e os *primers* AP1 e AP2.

A primeira reação de amplificação usou a combinação dos *primers* externos AP1/GSP1. Para a reação foram utilizados 1 µL (10 µM) de cada *primer*, 1 µL de DNAg de uma das bibliotecas (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* ou *StuI*), 5 µL do tampão Advantage 2 PCR Buffer 10X, 1 µL de dNTP mix (100 µM), 1 µL da enzima Advantage 2 DNA Polymerase (10U.µL<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>O (qsp 50 µL). A segunda reação de amplificação foi realizada com os *primers* internos AP2/GSP2 usando as mesmas condições que da primeira reação com 1 µL da diluição (1:50) do produto de amplificação da primeira PCR. As reações foram colocadas em aparelho termociclador seguindo as especificações do programa descritos na tabela 5. Os programas divergiram somente quanto ao número de ciclos entre as reações.

Tabela 5 Programa de termociclagem utilizado nas reações de amplificação pela técnica de GW. O número (*n*) de repetições do ciclo 6 difere-se entre as reações, assumindo os valores de 31 e 20 para a primeira e segunda, respectivamente.

Programa PCR					
Ciclo	Temperatura	Tempo	Ciclo	Temperatura	Tempo
1	94° C	25"	5	69 °C	3'
	72° C	3'		Ir para o ciclo 4 (1X)	
	Ir para o ciclo 1 (1X)			94° C	25"
2	94° C	25"	6	68° C	3'
	71° C	3'		Ir para o ciclo 5 (1X)	
	Ir para o ciclo 2 (1X)			94° C	25"
3	94° C	25"	7	67° C	3'
	70° C	3'		Ir para o ciclo 6 ( <i>n</i> vezes)	
	Ir para o ciclo 3 (1X)			67° C	7'
4	94° C	25"		4° C	∞

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1 % TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA pH 8) corado com EtBr (10 g.L<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta (UV). Em seguida, as amostras foram purificadas utilizando o kit Wizard®SV Gel and Clean Up System (Promega) e quantificadas quanto à pureza por espectrofotometria (NanoDrop DN-1000) pela leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm.

### 3.10 Clonagem dos promotores

Os fragmentos de PCR obtidos pela metodologia 5'RACE (kit Genome Walker) (item 3.9) purificados foram clonados no vetor pCR®2.1 (Figura 11) com o kit TA Cloning (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de ligação contendo 5 µL de água estéril, 1 µL de 10X Ligation Buffer, 2 µL do vetor PCR 2.1 (25 ng.µL<sup>-1</sup>), 1 µL do produto de PCR (10 ng) e 1 µL de T4 DNA ligase foi incubada a 14 °C durante 12h.

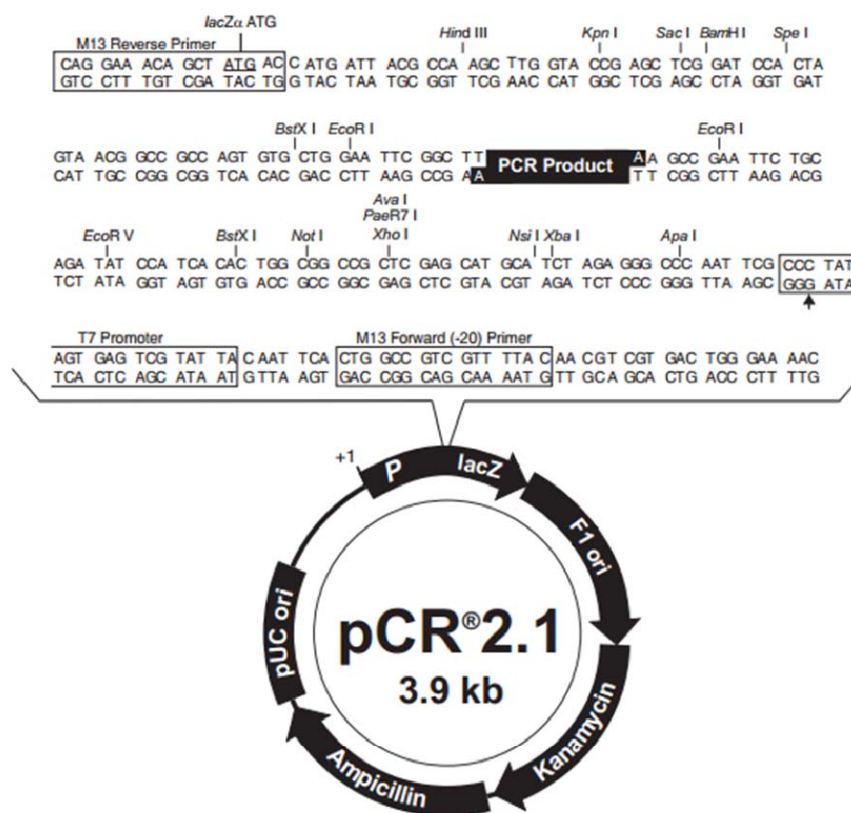


Figura 11 Representação esquemática com mapa do vetor pCR®2.1 linearizado. O sítio em que o produto de PCR é ligado está em destaque na figura.  
Fonte Invitrogen™.

Células competentes XL1 blue de *Escherichia coli* foram transformadas por eletroporação. Foram adicionados 4 µL da ligação em 40 µL de células competentes. A mistura foi transferida para a cubeta 0.2 mm. O material foi eletroporado nas condições de 2,5 V com 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância. O tempo da eletroporação foi de 6 a 7 s. Após a eletroporação, 1 mL de meio SOC gelado foi imediatamente adicionado para resuspender as células eletroporadas que foram incubadas à 37 °C por 1 h. Em seguida, 150 µL foram plaqueadas em LB sólido (50 mL) contendo ampicilina (100 mg.L<sup>-1</sup>) 100 µL de IPTG (24 mg.L<sup>-1</sup>) e 20 µL de X-GAL (40mg.L<sup>-1</sup>). Após 24 h a 37 °C, as



colônias transformadas (brancas) foram selecionadas para o isolamento do plasmídeo.

### 3.11 Mini extração de plasmídeos

Extrações plasmidiais foram feitas em células recombinantes previamente selecionadas e cultivadas em 1 mL de LB líquido contendo ampicilina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Após uma centrifugação (5 min,  $13792 \times g$ ), o precipitado foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 0,04 M; EDTA 50 mM, pH 8) no qual adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de NaSE (0,2 NaOH, 1 % SDS, 10 mM EDTA). Após nova agitação, as amostras ficaram em repouso à temperatura ambiente por 5 min. Acrescentou-se 30  $\mu\text{L}$  de KAc pH 4,8 e, após agitação, as amostras foram incubadas por 5 min no gelo. Após uma centrifugação ( $13400 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  de RNase A ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi adicionado ao sobrenadante que foi incubado em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 15 min. A mistura foi homogeneizada após a adição de 450  $\mu\text{L}$  de LiCl 5M, seguida de uma precipitação (60 min,  $-20^\circ\text{C}$ ) e uma centrifugação ( $4^\circ\text{C}$ , 10 min,  $13400 \times g$ ). O sobrenadante foi adicionado a 0,5 volume de isopropanol e incubado durante 5 min à temperatura ambiente antes de ser centrifugado ( $13400 \times g$  por 20 min, temperatura ambiente). Após descarte do sobrenadante, o sedimento (*pellet*) foi lavado uma vez em 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % e o DNA foi ressuspenso em 40  $\mu\text{L}$  de água estéril.

Para confirmação da clonagem dos fragmentos de DNA, uma reação de digestão foi feita em um volume total de 15  $\mu\text{L}$ , com 5  $\mu\text{L}$  do DNA obtido na mini extração, Tampão 10X H - Amersham Bioscience (1,5  $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima *EcoRI* (Amersham Bioscience) a  $15 \text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$ , e água bidestilada q.s.p 15  $\mu\text{L}$ . Para verificar o resultado das digestões, as mesmas foram analisadas em

gel de agarose 1 % TAE (tampão Tris-Acetato- EDTA) com 2  $\mu\text{L}$  de EtBr (10  $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 3.12 Sequenciamento de DNA

Cinco clones positivos de cada evento de transformação foram sequenciados pelo método Sanger (1979) em ambas as direções (com o *primer* universal M13 Forward ou M13 Reverse (Tabela 4) utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem), de acordo com as especificações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador PTC-100 (MJ Research), com o seguinte programa: temperatura de desnaturação inicial de 96 °C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas: 96 °C (desnaturação), por 10 s; 55 °C (anelamento), por 5 s; 60 °C (extensão), por 4 min e 4 °C (etapa final). Os produtos foram precipitados com a adição de 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75 % e centrifugados a 3220 x g por 45 min a 20 °C. Após a remoção do isopropanol e uma rápida centrifugação (spin), 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % foram adicionados em cada amostra para nova centrifugação (10 min, 20 °C). Após a remoção do etanol, as amostras foram secadas em estufa durante 30 minutos a 37 °C, ressuspendidas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida Hi Di (Applied Biosystem) e desnaturadas em termociclador por 5 min a 95 °C. Em seguida, as amostras foram sequenciadas na plataforma ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystem). Os resultados foram analisados com auxílio do programa 'Sequencing Analysis' versão 5.2 da (Applied Biosystem).

### 3.13 Análise *in silico* da região promotora

As sequências dos fragmentos obtidos por Genome Walker denominadas: 1AM (*DraI* – 1300 pb), 2AM (*EcoRV* – 850 pb), 3AM (*PvuII* – 950 pb) e 4AM (*StuI* – 1900 bp), foram isolados, clonados e sequenciados e os eletroferogramas obtidos foram analisados quanto a qualidade com o programa Phred disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> (TOGAWA e BRIGIDO, 2003; TOGAWA et al., 2006). As sequências consenso *forward* ou *reverse* dos cinco clones foram alinhadas e as sequências consenso obtidas para cada amostra (1AM, 2AM, 3AM, 4AM ou 5AM) foram analisadas por meio do programa Chromas 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), seguido por alinhamento e conversão ao formato FASTA. Todas as sequências foram clusterizadas em um contig com o ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

A partir da sequência consenso do contig representante da sequência promotora do gene *CaLTP* e nas análises *in silico* realizadas nos programas PlantCare, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> e PLACE, [www.dna.affrc.go.jp](http://www.dna.affrc.go.jp)) foi possível arquitetar os *primers* (F1pBI, F2pBI, F3pBI, F4Pbi e R1pBI) (Tabela 4) para amplificar diferentes fragmentos promotores (1253 pb, 1048 pb, 828 pb e 451 pb) visando clonagem no vetor binário para a transformação da planta modelo de tabaco. O objetivo das construções é caracterizar funcionalmente o núcleo promotor e avaliar a influência dos motivos *cis* de regulação na manifestação da fruto-especificidade na expressão do gene reporte *uidA* codificando para a enzima GUS em plantas transgênicas de tabaco.

Após a clonagem do promotor putativo pelo método 5' RACE, sequenciamento e montagem do *contig*, novas amplificações foram realizadas. Com base nesta sequência consenso obtida (*contig*) foram desenhados *primers* para amplificar quatro fragmentos da região promotora.

### 3.14 Isolamento dos diferentes fragmentos da região promotora do gene *CaLTP3*

As reações de PCR para amplificar os fragmentos promotores foram realizadas com os respectivos *primers forward* F1pBI, F2pBI, F3pBI, F4pBI em combinação com o reverse R1pBI (Tabela 4). Os *primers* (3 µL) foram adicionados à reação na concentração de 10 µM cada com 1 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) (Gibco), 5 µL do DNA genômico 1:10 de *C. arabica* var Catuaí amarelo, MgCl<sub>2</sub> 25mM (2 µL), 5 µL de PCR Buffer 10X (-Mg), 3 µL dNTP 10mM e água bidestilada q.s.p 50 µL. As amostras foram incubadas em termociclador com o seguinte programa: 96 °C por 1 min; 30 ciclos - 96 °C por 30 s, 51 °C por 20 s, 72 °C por 40 s – 72 °C por 5 min e 4 °C . As amostras aplicadas em gel de agarose 1 % TAE corado com EtBr (10g.L<sup>-1</sup>) foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) para verificar as amplificações. Os fragmentos específicos foram excisados do gel com auxílio de uma lâmina, imediatamente purificados utilizando o “kit” Wizard®SV Gel and Clean Up System (Promega) e quantificados quanto à pureza por espectrofotometria (NanoDrop DN-1000) nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm.

Em seguida, a reação de digestão com a enzima *Hind III* (10u/µL) (Promega) e *Bam hI* (10u/ µL) (Promega) foi realizada à 37 °C por 2 h para todos os fragmentos promotores. As enzimas *Hind III* e *Bam hI* foram adicionadas (1µL cada) à reação de digestão com 10 µL de tampão 10X (Buffer E), 40 µL de água estéril e 50 µL do DNA de um dos fragmentos promotores. Em paralelo, o vetor pBI 121 (Figura 12) foi extraído de células de *E.coli* após inóculo em meio LB por 16 h, de acordo com o protocolo de extração plasmidial descrito no tópico 3.11 . O DNA obtido na mini extração plasmidial (65ng/ µl) foi adicionado (100 µl) à reação com 20 µL de tampão 10X (Buffer E), 1 µL de cada enzima - *Hind III* e *Bam hI*, e 78 µL de água estéril. A reação de digestão



dos fragmentos promotores do gene *CaLTP3* clonados no lugar do promotor constitutivo CaMV 35S (Figura 12). Uma construção foi mantida com o promotor 35S para o controle positivo dos experimentos.

Os vetores binários construídos foram inseridos em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 por meio de eletroporação. Em um tubo para microcentrífuga contendo 40 µL de células, foi adicionado 1 µL (50-300 ng.µL<sup>-1</sup>) de plasmídeo e a mistura foi transferida para cuvetas de 0,2 cm. Em seguida, as células foram submetidas à pulso elétrico de 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω, 6,2 s foi adicionado imediatamente após o estímulo 1 mL de meio SOC (SAMBROOK et al., 1989) à cuvetas de eletroporação. A cultura foi transferida para novo tubo de microcentrífuga e incubada (60 min, 28 °C) antes de ser plaqueadas (100 µL) em meio LB sólido (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) adicionado de canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>), gentamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e incubadas a 28 °C por 48 h.

### 3.16 Cultura de tecidos

A transformação de tabaco foi realizada pelo método de co-cultura de segmentos foliares via *A. tumefaciens* (BARROS, 1989), com algumas adaptações. Folhas das plantas cultivadas em casa de vegetação foram lavadas com etanol 50 %, incubadas em hipoclorito de sódio 2 % durante 30 min e lavadas três vezes com água estéril. As folhas desinfetadas foram cortadas em pequenos segmentos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> e incubadas em suspensão de agrobactéria durante 5 min. Em seguida, os segmentos foliares foram secos em papel filtro e transferidos para placas-de-Petri contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> e agarose 0.7 %. Após dois dias de co-cultivo os explantes foram lavados em meio MS líquido contendo o antibiótico cefotaxima para eliminar a agrobactéria e finalmente

colocados em Placa-de-Petri contendo meio MS acrescido de BAP  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , cefotaxima  $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o antibiótico para seleção das células transformadas. Após duas semanas, os explantes foram transferidos para meio novo permanecendo até a formação dos brotos o que ocorreu em aproximadamente seis semanas. Os brotos foram transferidos para meio MS até o completo enraizamento das plantas quando finalmente foram transferidos para a casa de vegetação.

### **3.16.1 Transformação de *Nicotiana tabacum* por *Agrobacterium tumefaciens***

As colônias de agrobactéria contendo os novos vetores binários pBI121 foram inoculadas em 5 mL de meio LB (SAMBROOK et al., 1989), canamicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), gentamicina ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e incubadas a 180 rpm por aproximadamente 24 h a  $28^\circ\text{C}$ . Esse pré-inóculo ( $50 \text{ } \mu\text{L}$ ) foi adicionado em 50 mL de meio LB e novamente incubados a 180 rpm por aproximadamente a  $28^\circ\text{C}$  por 16 h.

Folhas jovens de plantas de tabaco, 60 dias após o plantio da semente, cultivadas em casa de vegetação foram coletadas e imediatamente colocadas em água. Em capela de fluxo laminar horizontal, as folhas foram lavadas com 1 L de álcool 50 % (v/v) e em seguida desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2 % (p/v) por 20 min. Após este período, as folhas foram lavadas três vezes em água estéril e mantidas em um béquer com água bidestilada estéril enquanto não eram manipuladas.

Concomitantemente, a cultura bacteriana foi distribuída em duas placas de Petri e deixadas na capela. As bordas e nervuras das folhas foram retiradas e o limbo foliar restante foi cortado em quadrados de 0,5 cm aproximadamente. A medida que eram cortados, os explantes foram mergulhados na cultura de *A. tumefaciens* até que as duas placas de Petri contendo a cultura bacteriana

ficassem com toda a superfície coberta com os explantes foliares. Os controles negativos foram mergulhados em meio LB sem bactéria. Em seguida, os explantes foram transferidos para papel filtro a fim de retirar o excesso da cultura bacteriana e colocados em placas de Petri contendo o meio MS (SIGMA) (MURASHIGE e SKOOG, 1962) pH 5,6-5,8 com sacarose 3 % (p/v), 6-benzilaminopurina (Sigma) ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e ágar 0.8 %, purificado para cultura de tecidos – Sigma), com a superfície adaxial voltada para o meio. As placas foram fechadas com filme de PVC e colocadas em sala de cultura a 28 °C por dois dias no escuro.

### **3.16.2 Seleção das plantas transformadas**

Os explantes foliares foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido com os antibióticos cefotaxima ( $500 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e canamicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As placas foram fechadas com filme de PVC e incubadas em sala de cultura 28 °C com fotoperíodo controlado de 16 h de luz. Após duas semanas, os explantes foram transferidos para novas placas contendo o meio MS nas mesmas condições de cultivo. Após um mês, os brotos regenerados foram transferidos para tubos de ensaio com meio MS sólido com cefotaxima ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e canamicina ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os brotos foram colocados na sala de cultura nas condições descritas anteriormente. Os brotos não transformados (controle negativo) foram transferidos para os tubos contendo o mesmo meio de cultura usado para os brotos transformados, porém, sem a adição de antibióticos.

### **3.16.3 Aclimação**

As plantas que enraizaram nos tubos de ensaio foram transferidas para sacos pequenos com solo adubado quimicamente. Após a lavagem das raízes



com água para retirar o meio de cultura, a planta foi colocada na terra e coberta com saco plástico transparente. Durante esta etapa, foram coletadas raízes e folhas para a realização do teste histoquímico para detecção da atividade da enzima repórter GUS. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e os sacos plásticos foram abertos progressivamente em suas extremidades a partir da primeira semana para permitir a aclimação gradativa das plantas às condições da casa de vegetação. Após duas semanas, os sacos plásticos foram completamente retirados. Posteriormente, as plantas foram transferidas para sacos maiores até a coleta das amostras.

### **3.17 Análises do número de cópias das plantas transformadas**

Transformantes T0 independentes regenerados de cada construção foram autofecundados. As plantas T1 obtidas foram analisadas quanto à resistência à canamicina por exame de frequência para identificar as plantas com apenas uma única cópia do T-DNA integrado ao genoma. Sementes das plantas transformadas T0, resultantes da autofecundação, foram semeadas em meio MS contendo canamicina para análises da segregação dos transgenes. Foram inoculadas 200 sementes de cada planta e após quatro semanas foi contado o número de plantas resistentes. A proporção de sementes resistentes e sensíveis a Canamicina foi analisada estatisticamente pelo Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

### **3.18 Ensaio Histoquímico**

Os ensaios histoquímicos foram realizados segundo o protocolo descrito por Jefferson (1987) e modificado por Guivarc'H (1996). Segmentos foliares e raízes jovens, tecidos florais e frutos de tabaco foram colocados em solução

contendo o substrato da enzima 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucuronídeo (X-glucA): tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.0, ferricianeto de potássio 3 mM, ferrocianeto de potássio 3 mM, EDTA 10 mM pH 7.0, X-glucA 2 mM dissolvido em 500  $\mu$ L de DMSO. Os tecidos foram incubados nesta solução durante 16h. a 37 °C. Em seguida, foram transferidos para solução de etanol 70 % (v/v) durante 48 h com trocas esporádicas do etanol 70 % (v/v), para a extração da clorofila a fim de facilitar a observação da coloração azul.

### 3.19 Ensaio Fluorimétrico

O ensaio fluorimétrico para a medição da atividade GUS foi conduzido como descrito por Gallagher (1992). Para tal, proteínas solúveis foram extraídas de folhas de plantas de tabaco autofertilizadas em tampão fosfato (50 mM de fosfato de sódio (pH 7.0), 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 40 mM 2- $\beta$ -mercaptoetanol) sem detergente. Assim, 3  $\mu$ g de proteínas solúveis foram incubadas tampão fosfato e 1 mM de MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicuronídeo) em uma reação com 50 $\mu$ L de volume final. Após os tempos de reação de 0, 15, 30 e 45 min foi adicionado 150 $\mu$ L de tampão de parada, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M. Uma curva padrão com o produto da reação MU (4-metil umbeliferona) nas concentrações de 25  $\mu$ M a 2,5  $\mu$ M foi feita para estimar as unidades de fluorescência (UF) das amostras. A fluorescência foi mensurada no equipamento Enpire 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer), que foi ajustado para emitir luz no comprimento de onda 365 nm (excitação) e capturar fluorescência no comprimento de onda 455 nm (emissão). A concentração do extrato protéico foi estimada pela curva padrão (2 a 12  $\mu$ g) da proteína de Soro Bovino (BSA) de acordo com o método de Bradford (1976).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises *in silico* de contigs *nsLTPs* em *Coffea spp.*

Transcritos com expressão preferencial em frutos nos estádios iniciais do desenvolvimento (1, 2 e 3) de *Coffea racemosa* foram identificados por *Northern* eletrônico utilizando o teste estatístico de Fisher, realizado no projeto Genoma Café Brasileiro armazenado no banco de dados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>). As análises *in silico* permitiram identificar 57 contigs candidatos com variados perfis de expressão nos grupos contrastantes A (fruto nos estádios iniciais do desenvolvimento) e B (outras bibliotecas do banco) (Tabela 3). Destes candidatos, 40 contigs que apresentaram forte expressão no grupo A e baixa expressão no grupo B, foram selecionados. Após análises destas sequências quanto à similaridade local no Banco de Dados de proteínas do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; ALTSCHUL, et al., 1990) e no banco nacional de patentes do INPI ([www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)), 8 contigs candidatos demonstraram-se inéditos. Dentre estes, o contig 18885 foi escolhido para ser validado e caracterizado *in vivo* (Figura 13) por apresentar o melhor perfil de expressão (forte expressão no grupo A e baixa expressão no grupo B), ineditismo e anotação funcional de interesse.

O contig 18885 apresenta similaridade (*e-value*  $10^{-4}$ ) com uma proteína de transferência de lipídeos não específica (*nsLTP*) de *Vigna unguiculata*. A sequência deste Unigene possui 506 pares de bases e é formado pelo alinhamento de 36 reads. O contig 18885 contém uma região 5' UTR (região transcrita não traduzida) de 53 bases, uma região 3' UTR de 156 bases e uma fase de leitura aberta (*open reading frame*) de 297 bases que codifica para uma proteína provável de 98 aminoácidos. No Banco de dados do GenBank, mais de

120 ESTs de outras espécies possuem alto nível de identidades (*e-value* de 0 a  $1e^{-100}$ ) a este *contig* por meio das análises feitas no BLASTn.

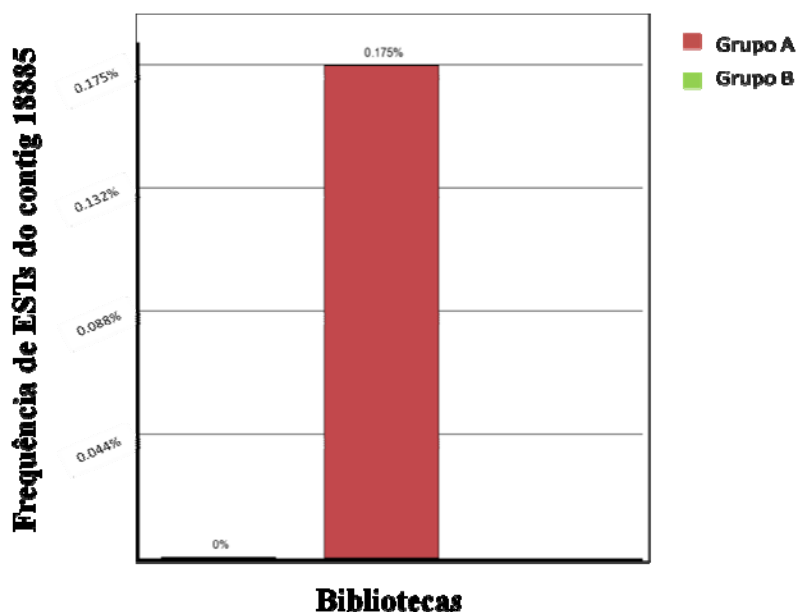


Figura 13 *Northern* eletrônico realizado no Banco de ESTs do Projeto Genoma Café Brasileiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>) Gráfico exibe o perfil de expressão em porcentagem (%) do *contig* 18885 baseado na frequência relativa de ESTs (ESTs do *contig*/total de ESTs das bibliotecas). Frequência das ESTs que compõem o *contig* 18885 das bibliotecas do grupo A (bibliotecas cDNA de frutos nos estádios iniciais do desenvolvimento) e B (outras bibliotecas).

Sequências nucleotídicas similares ao *contig* 18885 foram encontradas em Bancos de Dados públicos como Sol Genomics Network (SGN, <http://solgenomics.net/content/coffee.pl>; MUELLER et al., 2005; HarvEST, <http://harvest.ucr.edu/>; LIN et al., 2005) e Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>; MONDEGO et al., 2011) O *contig* 22413 identificado no Projeto Genoma Café por meio do banco de dados da Unicamp (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) apresentou identidade absoluta ao *contig*

18885. Uma vez que o acesso aos dados do Projeto Genoma Café por meio do banco de dados da Unicamp era de acesso público, o *contig* 22413 foi utilizado como sequência de referência para análises subsequentes.

Análises das ESTs presentes em bibliotecas de cDNA de frutos de *C. racemosa*, *C. arabica* e *C. canephora* no Banco de Dados SOL (<http://solgenomics.net>) identificaram os Unigenes (i) SGNCaU607388 e SGNCaU610393 de *C. arabica*, formados por ESTs de frutos colhidos em 15, 26 e 28 semanas após a floração (SAF); (ii) SGNCcU613906 de *C. canephora*, formado pela montagem de 34 ESTs de frutos (perisperma e endosperma) coletados em 18 e 30 SAF. Uma vez alinhadas, todas essas sequências mostraram alta identidade à região codificadora da *nsLTP* putativa (*contig* 22413) aqui estudada, com exceção da deleção de 56 pb encontrada no *contig* SGNCaU610393 (Figura 14). Entretanto, divergências foram observadas nas regiões UTR das sequências alinhadas, como a deleção de uma sequência de 13 pb na região 3'UTR (67 bases após o códon de parada, TAA) nos *contigs* SGNCaU607388 e SGNCcU613906 (Figura 14). O *contig* SGNCaU607388 se assemelha com SGNCcU613906 enquanto os *contigs* SGNCaU610393 e 22413 parecem formar grupos isolados. Esses resultados demonstram a provável existência de dois genes homoeólogos de *nsLTPs* em *C. arabica*, um do subgenoma de *C. canephora* e outro, por exclusão, seria oriundo do subgenoma de *C. eugenioides*.

```

SGNCaU607388 -aagaaacagttgaagccatctacagaatttcattttaactttctcttctgcactttttgc 59
SGNCcU613906 caccagg--gtcgaagccatctacagaatttcattttaactttctcttctgcactttttgc 58
SGNCaU610393 -aagaaacagttgaagccatctacagaatttcattttaactttctcttctgcactttttgc 59
Contig22413 -----gccatctgcaaaatatacatttaactttctctattgcgctttttgc 45
***** ** * * * *****

SGNCaU607388 ttttcataatgATGAAGAAATCATCTGGGGTTGCACTGTGCTGGTGTCTGGTAGTACTGT 119
SGNCcU613906 ttttcataatgATGAAGAAATCATCTGGGGTTGCACTGTGCTGGTGTCTGGTAGCACTGT 118
SGNCaU610393 ttttcataatgATGAAGAAATCCTCTGGAGTTGCATTGTGCTGGTGTCTGGTGGTACTGT 119
Contig22413 ttttcataaagATGAAGAAATCATCTGGGGTTGCACTGTGCTGGTGTCTGGTGTACTGT 105
***** ** * * * *****
LTP-F3
SGNCaU607388 TGCTGGTGGGTCTGGGGCAAAATCCAAGAGGCGGAGGAGCGCGGCTGCAATGCTCAAGCAT 179
SGNCcU613906 TGCTGGTGGGTCTGGGGCAAAATCCAAGAGGCGGAGGAGCGCGGCTGCAATGCTCAAGCAT 178
SGNCaU610393 TGCTGGTGGGTCTGGGGCAAAATCCA----- 144
Contig22413 TGCTGGTGGATCTGGGGCAAAATCCGAGAGGCGGAGGAGCTCGGCTGCAATCCTCAAGCAT 165
***** ** * * * *****
LTP-F4
SGNCaU607388 TGAGTCCATGCTTGCCCTCCATCATAAACGGCACTCCACCAAGCAAAGAATGCTGCACAA 239
SGNCcU613906 TGAGTCCATGCTTGCCCTCCATCATAAACGGCACTCCACCAAGCAAAGAATGCTGCACAA 238
SGNCaU610393 TGAGTCCATGCTTGCCCTCCATCATAAACGGCACTCCACCAAGCAAAGAATGCTGCACAA 183
Contig22413 TGAGTCCATGCTTGCCCTCCATCATAAAGACATTCACCAAGCCCAATGCTGCACAA 225
***** ** * * * *****
LTP-F4
SGNCaU607388 ATGCCAAGGAACAGGAGCCGTGCTTCTGCAATTTTATCAAAGATCCAGCATACGGCAAAA 299
SGNCcU613906 ATGCCAAGGAACAGGAGCCGTGCTTTTGCAATTTTATCAAAGATCCAGCATACGGCAAAA 298
SGNCaU610393 ATGCCAAGGAACAGGAGCCGTGCTTTTGCAATTTTATCAAAGATCCAGCGTACGGCAAGA 243
Contig22413 ATGTCAGGAACAGGAGCCGTGCTTTTGCAATTTTATCAAAGATCCAGCATACGGCAACA 285
***** ** * * * *****

SGNCaU607388 TTATAAAAAATCCCAATACCAAAAAAACTCTTGAAGCCTGTGGTCTGAAATGGCCAACTT 359
SGNCcU613906 TTATAAAAAATCCCAATACCAAAAAAACTCTTGAAGCCTGTGGTCTGAAATGGCCAACTT 358
SGNCaU610393 TTATAAAAAATCCCAATACCAAAAAAACTCTTGAAGCCTGTGGTCTGAAATGGCCAACTT 303
Contig22413 TTATAAAAAATCCCAATACCAAAAAAACTCTTGAAGCCTGTGGTCTGAAATGGCCAACTT 345
***** ** * * * *****

SGNCaU607388 GTCCATAAacgaccgctccattaaagttttatttcgggctggtcagatgtatcttctctta 419
SGNCcU613906 GTCCATAAacgaccgctccattaaagttttatttcgggctggtcagatgtatcttctctta 418
SGNCaU610393 gtccataaatcgaccgctccattaaagttttatttcgggctagtcataatgtatcttctctta 363
Contig22413 GTCCATAAacgaccgctccattaaagttttatttcgggctagtcataatgtatcttctctta 405
***** ** * * * *****

SGNCaU607388 tatgctcgaaaacta-----gtaatggtgttgaatgagaaatcata---tca 463
SGNCcU613906 tatgctcgaaaacta-----gtaatggtgttgaatgagaaatcata---tca 462
SGNCaU610393 tatgctcgaaaactggcaacgttctcatgtaatggtgtgaaagagaaataataatatca 423
Contig22413 tatgctcgaaaactaggcaacgttcccatgtaatggtgttgaacgagaaataata---tca 462
***** ** * * * *****

SGNCaU607388 ataatatctatgcgtcctttttttttttt---actaaaaaagaatttgtaaaccg 517
SGNCcU613906 ataatatctatgcgtcctttttttttttttataaaaaaaggatttgtaaaccg 518
SGNCaU610393 ataatatctatgc--tcctttttt-----ac----- 446
Contig22413 ataatatctatgcgtccctttttcc-----att----- 489
***** ** * * * *****

```

Figura 14 Alinhamento das sequências nucleicas de *nsLTPs* putativas de *Coffea spp* com o contig 22413. Os contigs SGNCaU607388 e SGNCaU610393 de *C. arabica* (Ca), o contig SGNCcU613906 de *C. canephora* (Cc) apresentam inserções/deleções em suas regiões UTRs em comparação ao contig 22413 de *C. racemosa* (Cr). A região 3'UTR de 13-pb (destacada no quadro) representa uma deleção nos contigs SGNCaU607388 e SGNCcU613906. Os nucleotídeos demarcados em cinza representam polimorfismos de base única. As setas horizontais representam os *primers* LTP F3 e F4 usados para amplificar a

sonda para os experimentos de *Northern* blot. A sequência *CaLTP* está representada pelo *contig* 22413.

Tal dedução subtrativa é condizente com os resultados encontrados no trabalho de Vidal e colaboradores (2010), que permitiu correlacionar 48 % das ESTs de *C. arabica* com transcritos da biblioteca do subgenoma de *C. canephora* e 52 % das sequências remanescentes foram atribuídas ao subgenoma de *C. eugenioides*. Marraccini e colaboradores (2011) identificaram dois genes homoeólogos da *RBCS1* em *C. arabica*, um do subgenoma de *C. canephora* e outro do subgenoma de *C. eugenioides*.

Os genes homoeólogos *nsLTP* dos subgenomas de *C. canephora* e *C. eugenioides* em *C. arabica* foram identificados como *CaCc* (representado pelos *contigs* SGNCaU607388 e SGNCcU613906) e *CaCe* (SGNCaU610393 e 22413) (Figura 14), respectivamente. A denominação genérica *CaLTP* (*Coffea arabica* Lipid Transfer Protein) foi utilizada quando os subgenomas não foram diferenciados.. A sequência do *contig* 22413 foi utilizada como sequência de referência para o desenho de *primers* (Tabela 4) visando (i) sintetizar a sonda dos experimentos de *Northern* blot, (ii) isolar os cDNAs e genes homoeólogos e ortólogos de *CaLTP*, respectivamente em *C. arabica* e *C. canephora*; (iii) analisar a expressão dos homoeólogos de *CaLTP* em *C. arabica* por RT-qPCR e (iv) isolar diferentes fragmentos da região promotora do gene *CaLTP*.

#### 4.2 Análise do perfil de expressão do gene *CaLTP* em *C. arabica*

A expressão órgão-temporal do gene *CaLTP* foi validada pela técnica de *Northern* blot e a expressão relativa de cada subgenoma do gene *CaLTP* em *C. arabica*, *CaCc* (representado pelos *contigs* SGNCaU607388 e SGNCcU613906) e *CaCe* (SGNCaU610393) foi caracterizada tecido-temporalmente ao longo do

desenvolvimento do fruto, e em meristemas plagiotrópicos de plantas submetidas ao déficit hídrico pela técnica de RT-qPCR.

O resultado do *Northern* blot evidencia a expressão órgão-específica do gene *CaLTP* em frutos de *C. arabica* var I59 com 120 DAF (Figura 15A e B). Os mRNAs *CaLTP* hibridizados possuem tamanho estimado de 400 bases. Em *C. arabica*, a sonda revelou a presença de mRNA *CaLTP* somente em frutos, pois nenhum dos transcritos foram revelados em folhas e raízes (Figuras 15A, 13B). *Northern* blot visando caracterizar o perfil de expressão temporal do gene *CaLTP* durante o desenvolvimento dos frutos de *C. arabica* var I59 permitiu identificar pico de expressão do gene *CaLTP* em frutos com 120 DAF. Os transcritos de frutos com 30, 60, 90, 150, 180 e 210 DAF não hibridizaram à sonda específica (Figuras 15C, 15D).



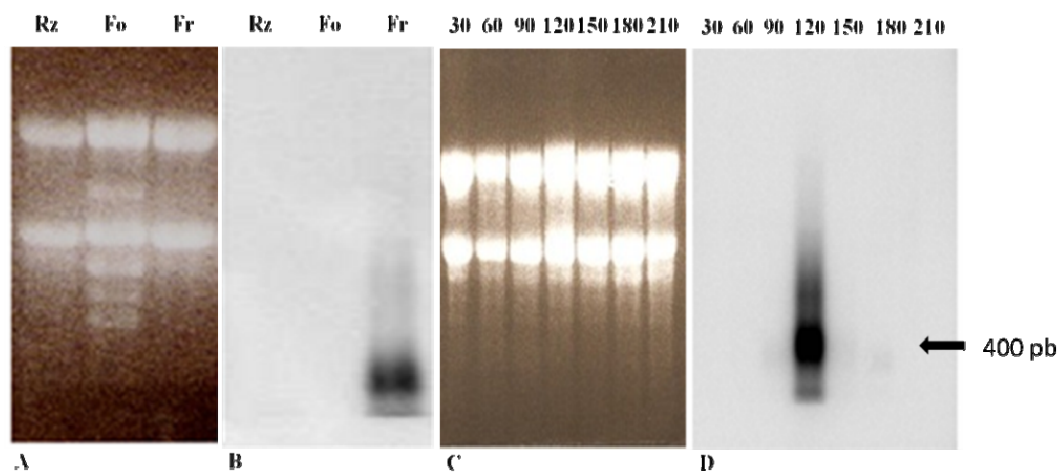


Figura 15 Perfil de expressão do gene *CaLTP* em *C. arabica*. (A) RNA total (20 µg) de raízes (Rz), folhas (Fo) de *C. arabica* var Catuaí amarelo e frutos inteiros (Fr) de 120 DAF de *C. arabica* var I59 (safra 2008/2009), separadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante. (B) Hibridização da sonda de *CaLTP* exclusivamente com transcritos de fruto de *C. arabica* var I59. (C) RNA total (20 µg) de frutos inteiros de *C. arabica* var I59 em diferentes estádios do desenvolvimento: 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 DAF. (D) Hibridização da sonda de *CaLTP* nos transcritos de frutos com 120 DAF. Os rRNAs foram corados com brometo de etídio para comparação da quantidade e qualidade das amostras (A e C).

Ensaio de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizados ao longo da maturação de frutos de *C. arabica* var I59 dissecados nos tecidos polpa, perisperma e endosperma (Figura 16). Tecidos meristemáticos de plantas de *C. arabica* var Rubi e I59 submetidas a estresse hídrico e em condições normais de desenvolvimento também foram avaliados (Figura 16). Os conjuntos de *primers* utilizados para quantificação relativa tecido-temporal dos transcritos foram os *primers* de referência para o controle endógeno do gene *Ubiquitina* (Nubi F e Nubi R) e os *primers* específicos para os homoeólogos *CaCc* (LTP1FT/LTP1R1) e *CaCe* (LTP1FT/LTP1R2) para identificar a expressão nos subgenomas parentais do gene *CaLTP* em *C. arabica*.

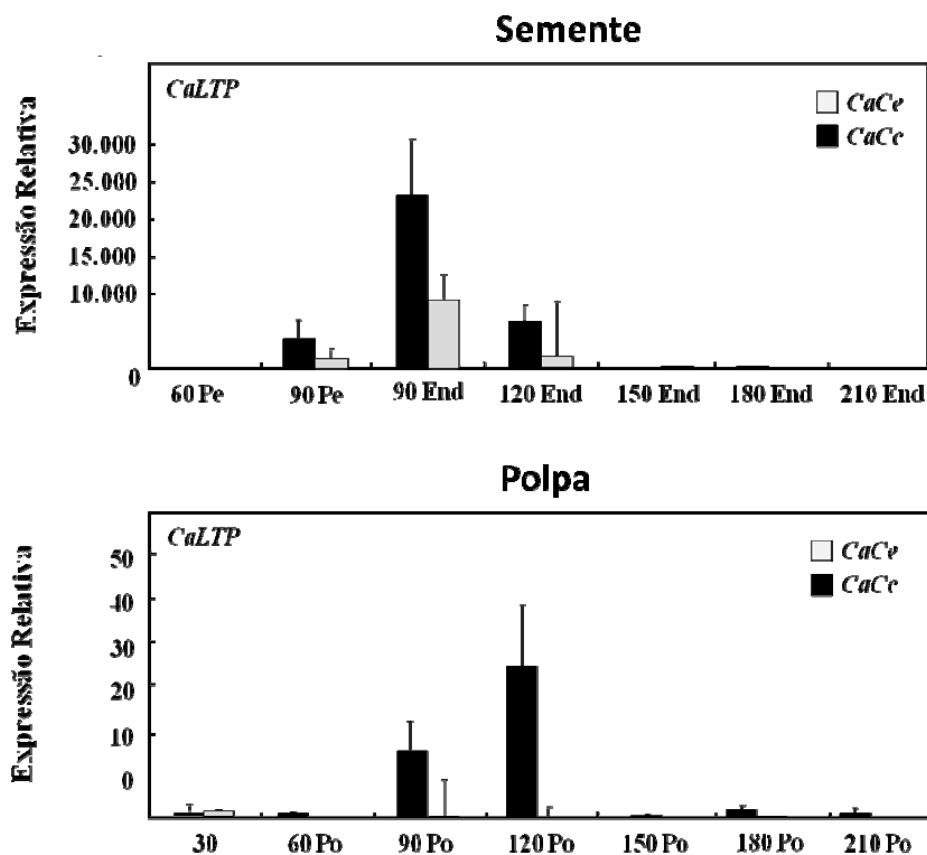


Figura 16 Caracterização do perfil de expressão de *CaLTP* em frutos de *C. arabica* var I59 (safra 2006/2007) dissecados em polpa (Po), perisperma (Pe) e endosperma (End). As isobarras verticais pretas representam a expressão dos homoeólogos de *C. canephora* (*CaCc*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R1 enquanto as isobarras cinzas representam os homoeólogos de *C. eugenioides* (*CaCe*) amplificados com os *primers* LTP1FT/LTP1R2. Os níveis de expressão relativa do transcrito de *CaLTP* em semente (A) e polpa (B) foram indicados usando como referência a expressão do gene *UBI*. Os resultados foram obtidos usando as amostras 60 DAF Pe e 30 DAF Po como calibradores internos (A e B, respectivamente). Em cada um dos casos, os valores são médias das triplicatas técnicas  $\pm$  o valor do desvio padrão.

*CaCc* apresentou níveis de expressão relativa em semente (Figura 16A) aproximadamente 1000x maior, quando comparado aos níveis de expressão em polpa (Figura 16B), nos frutos de *C. arabica* var I59. Picos de expressão em 90

DAF e 120 DAF foram observados para o homoeólogos *CaCc* em semente e polpa dos frutos de *C. arabica* var I59 . A máxima expressão aos 90 DAF (Figura 16A) em semente e aos 120 DAF em polpa (Figura 16B) evidencia inversão nos padrões de expressão nestes tecidos. Em todos os tecidos analisados do fruto, a expressão dos homoeólogos *CaCc* se destacaram em relação a expressão dos homoeólogos *CaCe*. A expressão relativa de *CaCe* não apresentou padrão similar nos tecidos analisados, sendo o nível de expressão em polpa insignificante.

Em plantas de *C. arabica* var I59 e Rubi irrigadas (I) não houve detecção significativa de expressão para os homoeólogos *CaCc* e *CaCe* em nenhuma das variedades. Nas plantas submetidas à estresse hídrico (NI) da variedade I59 foi possível observar maiores níveis de expressão dos homoeólogos de *CaCc* e *CaCe* em comparação aos da variedade Rubi. Não foi observada expressão do homoeólogo *CaCc* em plantas de *C. arabica* var Rubi não irrigadas, enquanto, *CaCe* apresentou baixo nível de expressão. Os níveis de expressão dos homoeólogos *CaCc* e *CaCe* em I59 não apresentam diferenças estatisticamente significativas (desvio padrão).

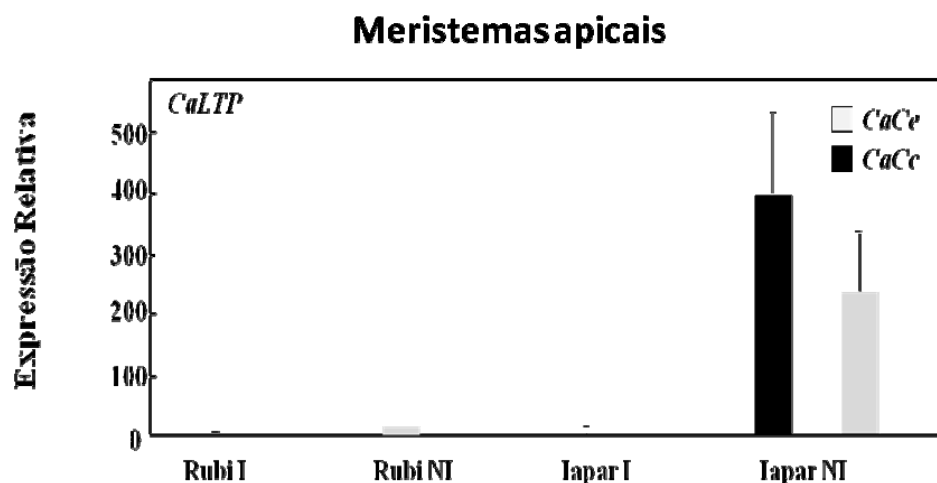


Figura 17 Perfil de expressão do gene *CaLTP* em meristemas de *C. arabica* var Rubi e I59 em plantas não irrigadas (NI) e irrigadas (I). As isobarras pretas representam os homoeólogos de *C. canephora* (*CaCe*) amplificados com os primers LTP1FT/LTP1R1 enquanto as isobarras cinzas representam os homoeólogos de *C. eugenoides* (*CaCe*) amplificados com os primers LTP1FT/LTP1R2. Os níveis de expressão relativa do transcrito de *nsLTP* em meristemas foram indicados usando como referência o gene *UBI*. Os resultados foram obtidos usando a amostra Rubi I como calibrador interno. Em cada um dos casos, os valores são médias das triplicatas técnicas  $\pm$  o valor do desvio padrão.

A expressão pontual do gene *CaLTP* em frutos de *C. arabica* var I59 com 120 DAF (figura 15B) identificada nos ensaios de *Northern blot* evidencia regulação espaço-temporal específica da expressão do gene. Os resultados de RT-qPCR permitem classificá-lo como um gene preferencialmente expresso em endosperma de frutos de *C. arabica* var I59 aos 90 DAF, uma vez que há também expressão em outros tecidos. Entretanto, mediante os baixos níveis de expressão encontrados em polpa e perisperma pode-se deduzir que o gene LTP tem caráter endosperma específico. A expressão do homoeólogo *CaCe* se sobrepõe a expressão de *CaCe* em sementes de *C. arabica*.

Tal expressão fruto-específica do gene *CaLTP* em *C. arabica* corrobora com resultados da literatura que atribuíram o acúmulo de LTP ao desenvolvimento do fruto (KALIFA et al., 2004; NETA-SHARIR et al., 2005). A expressão do gene *CaLTP* em polpa pode estar relacionada ao acúmulo da LTP na camada externa da epiderme do fruto para proteção contra patógenos ou degradação prematura (EKLUND e EDQVIST, 2003). Na semente, as LTPs têm sido implicadas na reciclagem de lipídeos do endosperma senescente, visando assegurar o crescimento correto do cotilédone em desenvolvimento, e atuam, também, como inibidoras de proteases, protegendo o endosperma da ação destas enzimas (EKLUND e EDQVIST, 2003).

A especificidade da expressão do gene *CaLTP* em endosperma de frutos de *C. arabica* com 90 e 120 DAF é condizente com os resultados do trabalho de Castro e Marraccini (2006). Esse estudo demonstrou que frutos de 90-150 DAF crescem como resultado do alargamento das células do perisperma simultaneamente à histodiferenciação e crescimento do endosperma e embrião, quando intensa atividade mitótica e expansão celular podem ser observadas. Até o período de 90 DAF, as células do endosperma são caracterizadas por paredes celulares finas que começam a engrossar nos estádios subsequentes. Foi postulado que as nsLTPs em plantas podem estar associadas com os componentes da parede celular hidrofóbica promovendo o rompimento ou facilitando a extensão da mesma (NIEUWLAND et al., 2005).

A diferença da expressão máxima entre as fases do desenvolvimento do fruto, observada nos resultados experimentais de *Northern blot* (120 DAF) e RT-qPCR (90 DAF), pode estar relacionada ao material vegetal utilizado. Frutos de *C. arabica* var I59 foram coletados para as duas análises no mesmo local, entretanto, duas safras (2006/2007 e 2008/2009) diferentes foram utilizadas para os experimentos. Tais diferenças observadas na expressão podem ser recorrentes das variações climáticas (índices pluviométricos, irradiação solar e oscilações de

temperatura) entre os anos 2006 e 2008 cujos efeitos influenciaram as safras 2006/2007 e 2008/2009. O deslocamento de 30 dias no padrão de precipitação (Figura 18) após o período de estiagem no ano de 2008 pode ter ocasionado o retardamento no desenvolvimento do fruto e consequentemente nos processos fisiológicos, visto que, a antese está geralmente associada a um ciclo de seca seguido por irrigação ou chuva (CRISOSTO, et al., 1992). O estresse-hídrico neste caso, não ocorreu durante o desenvolvimento dos frutos, mas antes da florada uma vez que os frutos das duas safras estavam no regime RH4 (sempre irrigado). O estresse hídrico antes da antese afeta diretamente a composição bioquímica dos frutos e por consequência as enzimas relacionadas às vias de síntese destes compostos (Marraccini, comunicação pessoal).

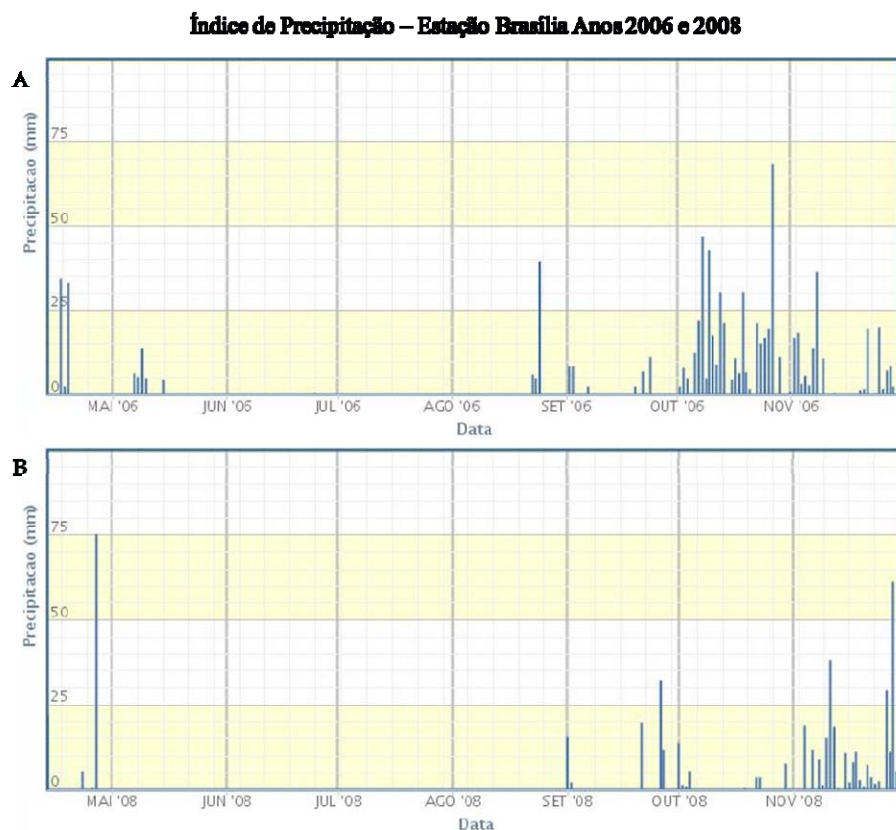


Figura 18 Índices de precipitação dos meses de abril a novembro de 2006 (A) e 2008 (B). O ano de 2008 apresentou 4 meses de estiagem enquanto o ano de 2006 apresentou 3 meses.

Fonte: INMET

O nível da expressão relativa do homoeólogo *CaCc* superior ao *CaCe* em endosperma de *C. arabica* pode ser explicado pelo conteúdo de lipídeos no grão das espécies parentais, *C. canephora* e *C. eugenoides*, e a consequente preservação do padrão de expressão dos homoeólogos dessas espécies no subgenoma de *C. arabica*. Em *C. canephora* e *C. eugenoides*, o teor de lipídeo do grão de café verde está entre 15 % e 10 %, respectivamente, e são principalmente formados por triacilgliceróis, esteróis, tocoferóis e diterpenos

(SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006). A maioria desses lipídeos está localizada no endosperma do grão verde de café, e uma pequena quantidade está presente na camada externa do grão (SPEER e KÖLLING-SPEER, 2006). Além disso, o nível de expressão superior do homoeólogo *CaCc* é condizente com dados da literatura que indicam que o transcriptoma *CaCc* parece atuar no refinamento da expressão gênica em *C. arabica*, na renovação de proteínas e transdução de sinal, enquanto a expressão do subgenoma *CaCe* parece estar intimamente relacionado à processos basais (VIDAL et al., 2010).

O resultado da expressão dos homoeólogos *CaCc* e *CaCe* em plantas não irrigadas de *C. arabica* var I59 apresentou nível superior se comparado ao encontrado na variedade Rubi. Estas plantas de *C. arabica* var I59 e Rubi sob estresse hídrico e em condições normais de desenvolvimento tiveram seus potenciais de água nas folhas medidos durante a seca de 2011. Os valores  $\psi_{pd}$  medidos para as plantas irrigadas Rubi e I59 foi de cerca de  $\psi_{pd}$  -0.2 MPa e para as plantas não irrigadas  $\psi_{pd} < -3.0$  MPa (Marraccini, comunicação pessoal). A introgressão recente do genoma de *C. canephora* na variedade I59 de *C. arabica* pode justificar a maior adaptação dessa variedade em relação ao Rubi, uma vez que a variedade Rubi é considerada um *C. arabica* ‘puro’. No que diz respeito à tolerância à seca, sabe-se que dentro da variabilidade genética existente no gênero *Coffea*, a espécie *C. canephora* apresenta maior tolerância ao estresse hídrico (Marraccini et al., 2011). Estudos mostram a adaptabilidade às condições de estresse hídrico de *C. arabica* da var I59 e var Rubi. Os potenciais de antemanhã ( $\psi_{pd}$ ) foram avaliados nos anos de 2008 e 2009 e foram sempre mais negativos para a var Rubi ( $\psi_{pd}$  -1,9 e -1,2) se comparado aos potenciais encontrados para I59 ( $\psi_{pd}$  -0,8 e -0,6) (RODRIGUES et al., 2010).

A expressão dos homoeólogos, *CaCc* e *CaCe* do gene *CaLTP* em plantas de *C. arabica* var I59, corrobora com estudos que evidenciaram a participação das nsLTPs no mecanismo de resposta ao estresse hídrico (JANG,



et al., 2004). Houve indução dos genes *LTP* em três plantas de tabaco expostas a eventos periódicos de seca gerando evidências de que as LTPs estão envolvidas na deposição da cera cuticular, importante mecanismo desenvolvido pela planta para a tolerância à seca (CAMERON et al., 2006). O tecido responsivo à seca analisado no presente trabalho é o meristema apical de ramos plagiotrópicos. Tais regiões frequentemente estão protegidas por emissões foliares e costumam ser responsivas a condições ambientais variadas, como nutrição pobre em carboidratos, baixa luminosidade, baixa temperatura e estresse hídrico que prolongam a fase de desenvolvimento juvenil, a fase adulta e reprodutiva dos ápices meristemáticos (POETHIG, 1990). Estudos de Rodrigues e colaboradores (2011) evidenciam que o fluxo de seiva e a abertura estomática são maiores em *C. arabica* var Rubi do que em I59 o que pode indicar menores indícios de adaptação às condições de estresse hídrico para esta espécie. A var I59 apresentou a camada de cera nas folhas mais espessa do que foi identificado nas folhas de Rubi.

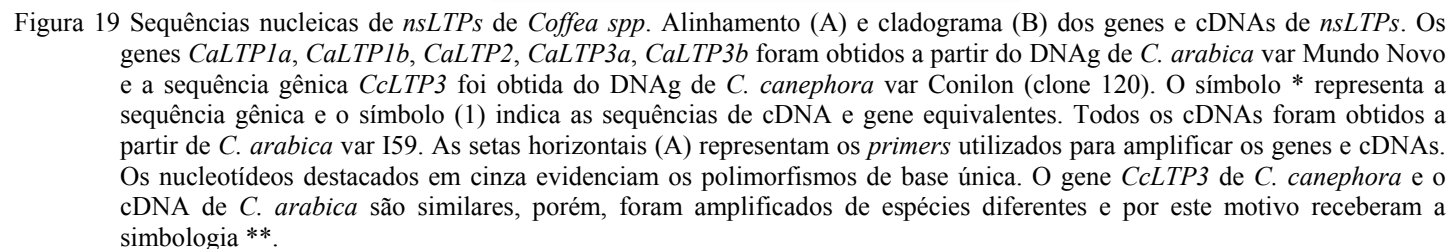
#### 4.3 Caracterização dos cDNAs e genes de *nsLTPs* de café

As diferenças observadas *in silico* entre os três *Unigenes* SGNCaU607388, SGNCaU610393, SGNCcU613906 e do *contig* 22413 permitiram desenhar *primers* específicos cujas combinações CgLTPF2/LTP1R2, CgLTPF1/LTP1R2 e CgLTPF1/LTP1R1 (Tabela 4) levaram ao isolamento de vários cDNAs denominados *CaLTP1a*, *CaLTP2* e *CaLTP3a* e expressos, em frutos de *C. arabica* var I59 (Figura 19A). As mesmas combinações de *primers* foram usadas também para amplificar os genes correspondentes que codificam *nsLTPs* das espécies de *C. arabica* var Mundo Novo e *C. canephora* var Conilon (clone 120). Para *C. arabica*, quatro sequências foram isoladas: *CaLTP1a* e *CaLTP1b* amplificadas com os *primers*

CgLTPF2/LTP1R2, *CaLTP2* amplificada com o par de *primers* CgLTPF1/LTP1R2 e *CaLTP3b* com a combinação de *primers* CgLTPF1/LTP1R1. Para *C. canephora*, o par de *primers* CgLTPF1/LTP1R1 foi o único a permitir uma amplificação e clonagem do gene *CcLTP3*.

Os alinhamentos dessas sequências permitem verificar que não há íntrons nos genes analisados. O cDNA *CaLTP1a* e o gene são idênticos e os genes *CaLTP1a* e *CaLTP1b* diferem somente por uma base (na posição 164). Além disso, o cDNA *CaLTP2* e as sequências gênicas são altamente idênticas mas divergem de *CaLTP1a* apenas por 2 bases na região 5' correspondendo à região de anelamento dos *primers* CgLTPF1 e CgLTPF2. As sequências *LTP3* foram agrupadas e caracterizadas por mudanças (13 pb) muito conservadas em suas regiões codantes o que permite distingui-las dos genes *LTP1* e *LTP2* (Figura 19B). O cDNA e os genes *CaLTP3* e *CcLTP3*, correspondentes de *C. arabica* e *C. canephora* respectivamente, também diferem por 5 bases em suas sequências *LTP*-codantes.

As sequências nucleotídicas dos *contigs* 22413 e SGNCcU613906, dos genes e cDNAs foram comparadas quanto à similaridade local no Banco de Dados de proteínas do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; ALTSCHUL et al., 1990). As sequências proteicas deduzidas foram alinhadas globalmente no CLUSTALW e os peptídeos sinal de cada sequência foram identificados pelo programa TargetP (EMANUELSSON, et al, 2007) (Figura 20A). Os alinhamentos das sequências nucleicas e proteicas foram utilizados para a elaboração de cladogramas capazes de relacionar evolutivamente as nsLTPs de Café (Figura 20B).



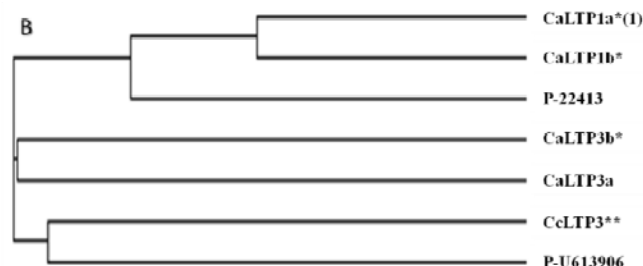


Figura 20 Sequências proteicas de nsLTPs de *Coffea spp.* Alinhamento (A) e cladograma (B) das proteínas CaLTP1a, CaLTP1b, CaLTP3a, CaLTP3b obtidas com sequências deduzidas dos genes previamente clonados a partir de *C. arabica* var Mundo Novo e do gene *CcLTP3* de *C. canephora* var Conilon (clone 120). As sequências proteicas P-22413 e P-U613906 foram deduzidas das sequências do *contig* 22413 e do unigene SGNCcU613906, respectivamente. O símbolo \* representa a sequência das proteínas deduzidas das sequências gênica e o símbolo (1) indica as sequências das proteínas deduzidas de sequências de cDNA e gene equivalentes. Todos os cDNAs foram obtidos a partir de *C. arabica* var I59. Os aminoácidos destacados em cinza evidenciam as mutações missense. A sequência proteica CcLTP3 foi obtida da sequência do gene CcLTP3 de *C. canephora* e do cDNA CaLTP3 de *C. arabica* que, mesmo isoladas de espécies diferentes em *CcLTP3*, são similares receberam a simbologia \*\*.

Todas as sequências proteicas das quatro LTPs têm o mesmo comprimento (98 aminoácidos) com massa molecular teórica similar ( $\approx 10.4$  kDa) e ponto isoelétrico estimado ( $pI \approx 8.5$ ). Além disso, tais proteínas contêm um peptídeo sinal com o sítio de clivagem entre os resíduos de aminoácidos A<sub>29</sub> e A<sub>30</sub>/V<sub>30</sub>. A proteína CaLTP1a (deduzida do gene e cDNA *CaLTP1*) e a proteína CaLTP2 (deduzida do gene e cDNA *CaLTP2*) são estritamente idênticas enquanto as proteínas CaLTP1a e CaLTP1b divergem na posição 48 em suas proteínas não processadas por somente um resíduo de aminoácido. Uma identidade absoluta foi observada entre as proteínas CaLTP3b e P-U607388. Além do resíduo de aminoácido (na posição 53), as proteínas CcLTP3 e P-U613906 também estiveram estritamente relacionadas. Nas nsLTPs de café estudadas, a proteína P-22413 foi a que mais divergiu, como esperado uma vez que a sequência nucleotídica utilizada para deduzir essa proteína é proveniente de *C. racemosa*. Esta espécie é evolutivamente mais distante de *C. arabica* do que *C. canephora* que por sua vez faz parte do grupo parental de *C. arabica*.

Nas formas maduras (sem o peptídeo sinal), essas nsLTPs contêm 69 aminoácidos e possuem massa molecular teórica similar (aproximada de 7.4kDa) e estimados pontos isoelétricos ( $P_i$  aproximados de 8.4) similares. As formas processadas das proteínas CaLTP3b e P-U613906 também parecem estritamente idênticas. Pesquisas para analisar a similaridade das sequências utilizando o programa Blastp no banco de dados do GenBank mostraram que a proteína CaLTP1a possui alta similaridade (e value  $4e-19$ , identidade 42 %, similaridade 65 %) com a provável nsLTP AKCS9 (GenBank ID: XP\_003528957) de soja (SCHMUTZ et al., 2010). Por outro lado, a proteína LTP3 tem alta homologia (e value  $2e-18$ ) com o precursor de nsLTP do tipo 2 (GenBank ID: CAH69201) de *Triticum aestivum* (BOUTROT, et al., 2007). Finalmente, a proteína P-U613906 apresentou o menor *e-value* ( $7e-18$ ) com a nsLTP (ID: Q43681) de *Vigna unguiculata* (KRAUSE et al., 1994).

Todas as *nsLTPs* de café isoladas e analisadas contêm um domínio conservado para nsLTP2 (cd01959) formado por 8 resíduos de cisteína (C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub>), o motivo C<sub>5</sub>XC<sub>6</sub> (caracterizado pela presença de resíduos hidrofóbicos como leucina ou fenilalanina na posição X) e, portanto, seguiram o padrão tipo II CX4LX2CX9-11P[S,T]X2CCX5QX2-4C[L,F]CX2[A,L,I]X[D,N]PX10-12[K,R]X4-5CX3-4PX0-2C delineado pelo Banco de Dados Prosite (Expasy) (ARTIMO et al., 2012) (Figura 21 B). No presente trabalho, adotamos a classificação das LTPs nos dois principais tipos (Tipo I e Tipo II), visto que a metodologia de classificação parece não ter se consolidado na literatura (BOUTROT et al., 2008; DOULIEZ et al., 2000; KADER, 1996; WANG et al., 2012).

A classificação dessas proteínas em nsLTP2 realizada pelos critérios descritos acima foi confirmada pela predição da estrutura tridimensional no banco de dados Phyre2 (KELLEY e STERNBERG, 2009; WASS et al., 2010). As estruturas obtidas são condizentes com a conformação das proteínas nsLTPs do tipo 2 que apresentam uma cavidade hidrofóbica triangular (HAN et al., 2001) (Figura 19 A e C), pequena e flexível o que é importante para sua função biológica (SAMUEL et al., 2002). Estudos de modelagem molecular sugerem que a plasticidade da cavidade hidrofóbica pode acomodar moléculas largas como esteróis e o seu pequeno tamanho parece útil para o aumento da eficiência de ligação de moléculas lipídicas (SAMUEL et al., 2002). O complexo nsLTP2/esterol pode se ligar a receptores que desencadeiam respostas de defesa na planta. A estrutura tridimensional da proteína nsLTP2 evidencia alta concentração de resíduos de cargas positivas na face flexível da molécula e peptídeos de defesa de muitas plantas também possuem uma grande concentração de resíduos de cargas positivas em uma das superfícies da molécula. Essas características permitem inferir pelo menos duas possíveis funções das nsLTP2 em plantas, uma proteína que transporta lipídeos

rapidamente pela membrana plasmática permanecendo na superfície celular para defesa contra patógenos (SAMUEL et al., 2002).

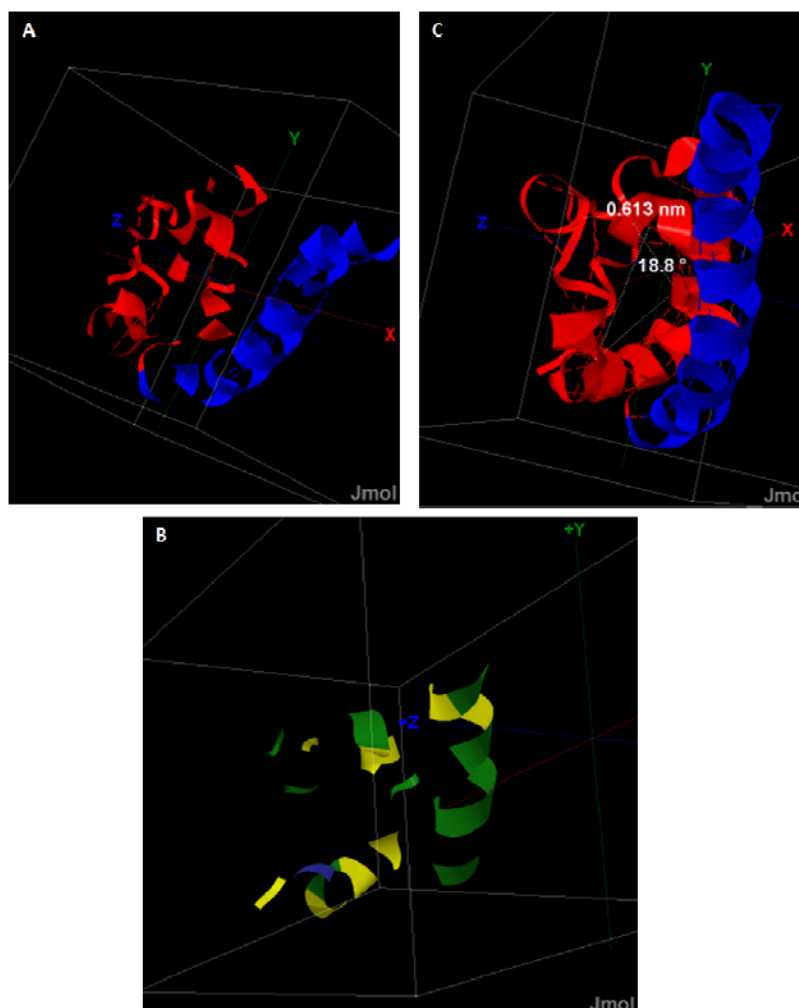


Figura 21 Estrutura tridimensional da CaLTP3 de *C. arabica* do tipo 2. (A) A estrutura evidencia os aminoácidos com propriedades físico-químicas apolares (vermelho e azul). (B) Identificação da estrutura  $C_5XC_6$  com os aminoácidos Leucina (verde), Cisteína (amarelo) e Fenilalanina (roxo) evidenciando o padrão de substituição do X por uma Leucina. (C) Estrutura completa da molécula com todos os aminoácidos permite identificar a pequena cavidade hidrofóbica triangular em vermelho e a calda C-terminal em azul (A e C).

Fonte Programa Phyre2



#### 4.4 Isolamento e análise do promotor de *CaLTP3*

Diante das análises das sequências de *nsLTPS* em *Coffea* spp, da validação experimental, caracterização do gene *CaLTP* em *C. arabica* e da importância funcional das nsLTPs em plantas, o promotor do gene *CaLTP* foi isolado e caracterizado. O gene homoeólogo *CaLTP3* foi escolhido por apresentar maior semelhança com a forma de *C. canephora* CcLTP3, cujo subgenoma demonstrou maior expressão dentre os transcritos de *CaLTP* nos experimentos de qPCR. Este promotor foi isolado a partir do DNA genômico de *C. arabica* var Catuaí Amarelo. Fragmentos da região promotora do gene *CaLTP3* foram amplificados pelo método 3'RACE usando o kit Genome Walker (Figura 22). Os fragmentos obtidos foram clonados, sequenciados e denominados: 1AM (DraI – 1300pb), 2AM (EcoRV – 850pb), 3AM (3PvuII – 950pb) e 4AM (StuI – 1900).

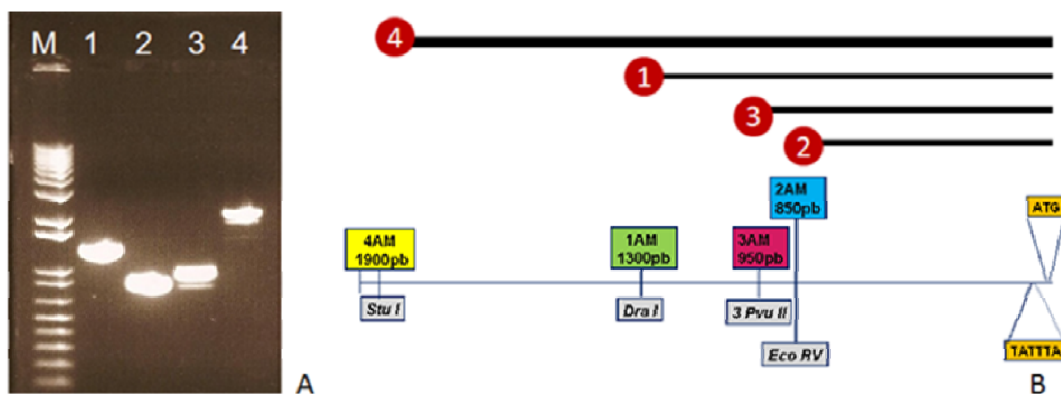


Figura 22 Isolamento do promotor de *CaLTP3*. Migração eletroforética dos fragmentos promotores obtidos a partir das bibliotecas do kit Genome Walker em gel de agarose. M: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder. Os números representam os fragmentos amplificados, 1: 1AM (Biblioteca DraI – 1300pb), 2 : 2AM (EcoRV – 850pb), 3: 3AM (3PvuII, 950pb) e 4: 4AM (Stu I – 1900).

As sequências senso e anti-senso dos cinco clones de cada evento de transformação foram analisadas, ajustadas e montadas visando à obtenção de uma sequência promotora consenso. Análises *in silico* dos motivos *cis* presentes nesta sequência promotora de 1362 pb possibilitaram desenhar os *primers* F1pBI, F2pBI, F3pBI, F4pBI e R1pBI (Tabela 4) para amplificar novos fragmentos promotores de diferentes tamanhos 1253 pb, 1048 pb, 828 pb e 451 pb, visando analisar os elementos *cis* essenciais para a expressão tecido-específica (Figura 23).

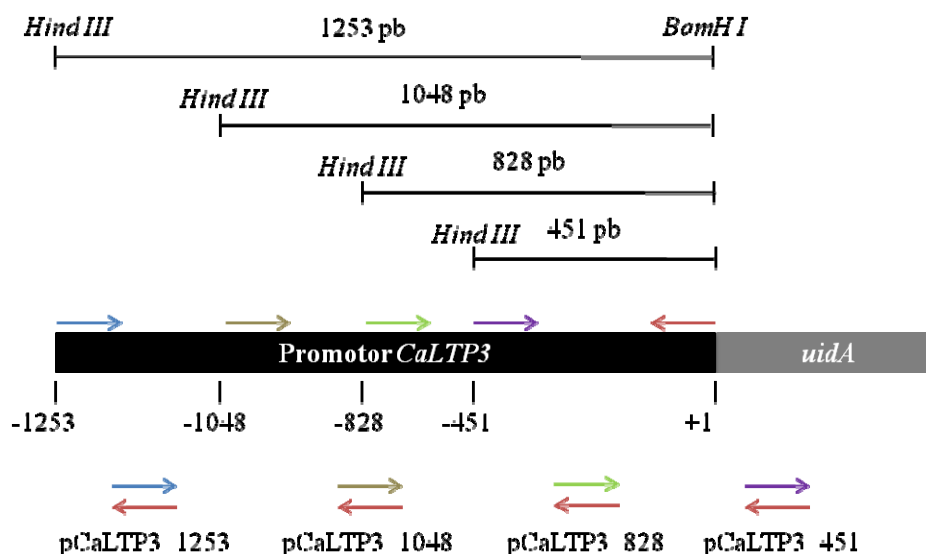


Figura 23 Representação esquemática das construções com os diferentes fragmentos promotores de *CaLTP3* em substituição ao promotor *CaMV35S* no vetor pBI121.

Depois de amplificados, estes quatro fragmentos promotores foram isolados e sequenciados. As sequências resultantes foram alinhadas com a sequência promotora consenso obtida por GW e com os cDNAs homoeólogos de *CaLTP* (Figura 24). O alinhamento entre os fragmentos promotores e a sequência consenso do Gw apresentaram baixos picos de divergência

nucleotídica (Figura 24A). Os altos picos de divergência observados representam a região do alinhamento entre as sequência do vetor (pBI 121) para as *pCaLTPs*, as regiões codificadoras dos homoeólogos de *CaLTP* e a sequência GW (Figura 24A). Uma região de *gap* foi adicionada visando alinhar o início da sequência codificadora dos genes *uidA* e *CaLTP* (Figura 24C). O quadro 1 comprova a similaridade entre as sequências promotoras e a sequência do GW. Os polimorfismos de base única (SNPs) destacados no quadro 2 e 3 representam regiões semi-conservadas. O quadro 2 destaca a região de anelamento dos *primers* forward utilizados para isolar os homoeólogos CaLTP. A identificação dos homoeólogos pelas análises *in silico* apresentaram padrões de polimorfismos característicos ao encontrado no quadro 3. Dessa forma, esse SNP foi utilizado para a caracterização do promotor de CaLTP isolado dentre os homoeólogos encontrados.

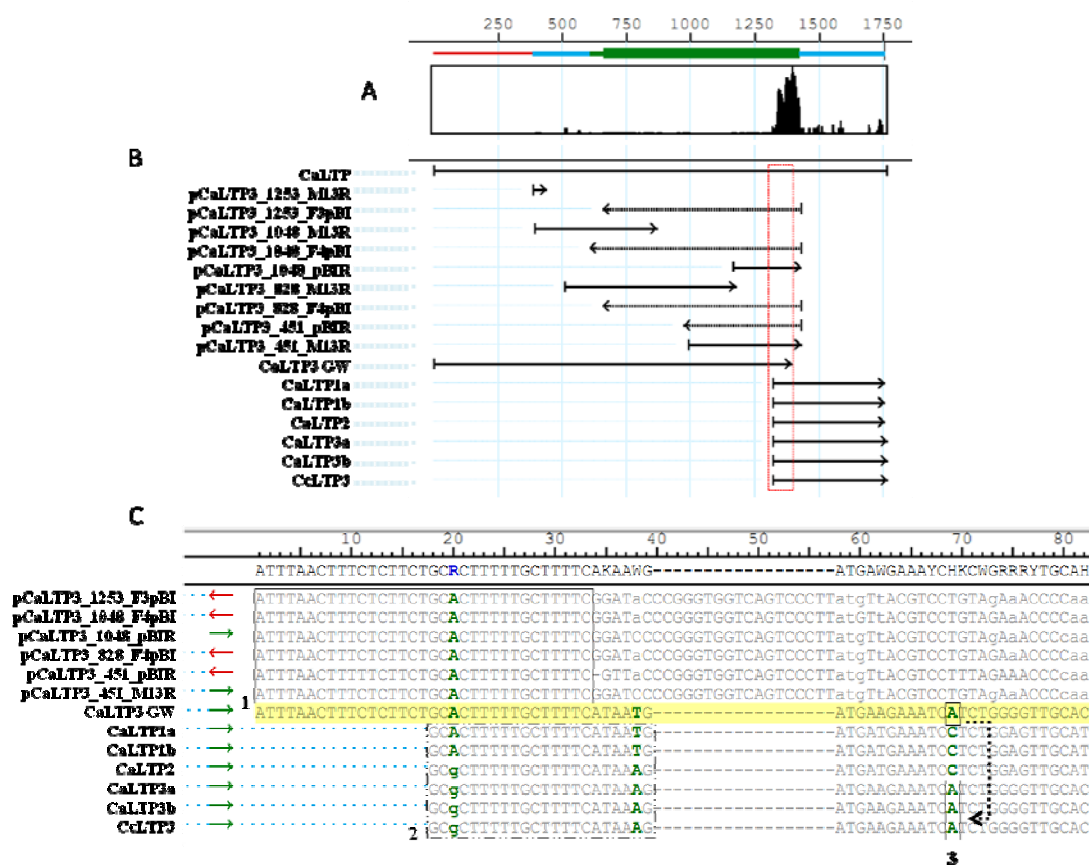


Figura 24 Alinhamento das sequências promotoras *CaLTP3* e regiões codificadoras homeólogas de *CaLTP*. (A) Representação esquemática da divergência nucleotídica observada nas sequências alinhadas. (B e C) Representação do fragmentos promotores (*pCaLTP3* de 1253 pb, 1048 pb, 828 pb, 451pb), sequência promotora consenso obtida por GW (*CaLTP3* GW) e sequência dos genes homoeólogos *CaLTP* (*CaLTP1a*, *CaLTP1b*, *CaLTP2*, *CaLTP3a*, *CaLTP3b*, *CcLTP3*). As setas representam o sentido de orientação das sequências. (B) Visão global do alinhamento onde a região destacada em vermelho está ampliada em C. (C) Os nucleotídeos em verde representam os polimorfismos de base única desta região. A sequência consenso do GW está em destaque. O quadro (1) evidencia a similaridade dos fragmentos promotores com a sequência promotora consenso do GW. O quadro (2) mostra a região de anelamento dos *primers* dos genes homoeólogos de *CaLTP*. O quadro (3) identifica região de similaridade entre a sequência GW e os genes homoeólogos.

Diante dos polimorfismos de base única observados nas sequências codificadoras dos genes homoeólogos de *CaLTP*, da identidade das sequências do GW com as sequências dos fragmentos promotores *pCaLTPs* e com o perfil

da região codificadora *CaLTP3a* e *CaLTP3b*, foi possível deduzir que o promotor aqui caracterizado regula a expressão do gene *CaLTP3* (Figura 24).

A sequência consenso dos fragmentos promotores de *CaLTP3* foi analisada quanto aos motivos *cis* de regulação presentes pelos bancos PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), PLACE ([www.dnaffrc.go.jp](http://www.dnaffrc.go.jp)) e Transfac 6 ([www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) (Figura 25 e 26). O promotor completo do gene *CaLTP3* apresenta em seu núcleo o elemento *cis* TATA Box (TATAAAT), repetições TATA ao longo da região promotora (Figura 25 e 26A) e análises nas sequências do cDNA e região gênica evidenciaram a ausência de íntrons demonstrando um padrão compacto do gene. O núcleo promotor com TATA tende a direcionar perfis de expressão tecido-específicos e apresentam estruturas gênicas mais compactas do que promotores sem TATA no que diz respeito ao número de éxons, comprimento de íntrons e tamanho do mRNA (MOSHONOV et al., 2008).



AAAG = Sítio DOFCOREZM de ligação a Dof1, Dof2, Dof3 e PBF

CAAT = CAATBOX

\*CCGTTG = Sítio de ligação do fator MYBHv1

ACGT = Motivo ACGT

CAAGT = Box de prolamina

CAACAA = Motivo AACA

ATCAT = Skin-1

CANNTG = E-box Myc

GATA = GATABOX

Figura 25: Sequência promotora consenso do gene *CaLTP3* obtida por Genome Walker. O motivo TATA Box (TATAAAT) e o sítio de início da tradução (ATG) estão destacados em caixas. Os *primers* utilizados para amplificar fragmentos promotores para o ensaio de expressão em *Nicotiana tabacum* estão identificados por setas horizontais. A região codificadora parcial encontra-se sublinhada. Elementos *cis* relacionados à regulação órgão-específica e responsiva à estresse biótico e abiótico estão identificados na sequência e descritos na legenda acima.

O promotor de *CaLTP3* apresentou os motivos AAAG, ACGT, Skin-1, E-box, AACA, Prolamina Box, GATA box (Figura 25 e 26). Mas, não apresentou o elemento de repetição RY, motivo A/T e GCN4 (Figura 25 e 26). Tais elementos *cis* podem estar associados a um padrão de expressão regulado espacial e temporalmente. Resultados obtidos por Washida e colaboradores (1999) demonstraram que os motivos AACA e GCN4 atuam como elementos chave na determinação da expressão semente-específica. Os elementos Skin-1,

ACGT e Prolamina Box são motivos moduladores dos níveis de expressão. A associação desses elementos *in tandem* pode exercer um efeito sinérgico e potencializador na regulação do processo transcricional tecido-específico, como a interação entre o motivo AACA e os elementos GCN4 ou ACGT (WASHIDA et al., 1999).

Alguns desses elementos *cis* foram encontrados em padrões sequenciais no promotor de *CaLTP3* (Figura 25 e 26D), como: i) GATA box e motivo Skin-1 (ATCAT), (ii) GATA box e motivo AACGT, (iii) GATA box, motivo ACGT e MYBCORE (Figura 26 D). O motivo GATA box é um elemento de regulação para o direcionamento da expressão tecido específica e em altos níveis (GILMARTIN et al., 1990). O elemento *cis*, MYBCORE, é um sítio de reconhecimento encontrado em promotores responsivos à desidratação mediados por ácido abscísico (ABA) (ABE, 2002). O sítio E-box (CAACTG) está relacionado à expressão semente específica em promotores de genes que codificam proteínas de armazenamento (THOMAS, 1993) embora o mesmo sítio de reconhecimento seja utilizado pelas proteínas estresse- responsivas MYC.

O promotor *CaLTP3* apresentou 13 motivos DOFCORE (Figura 26C) dentre os quais 7 são específicos para Dof2 e 2 para BPBF. O motivo *cis* Prolamina Box (CAAAGT) (Figura 25 e 26B) engloba o elemento *cis* DOFCORE (AAAG) que permite a ligação das proteínas Dofs: Dof 1, Dof 2, Dof 3 e BPBF (YANAGISAWA, 2002). O motivo *cis* PBF (WAAAGG) (Figura 25 e 26C), uma variação do motivo Prolamina Box, permite a ligação de proteínas BPBF e SED. As proteínas Dof do tipo BPBF são endosperma específicas. A proteína Dof2 está envolvida na regulação da germinação da semente (YANAGISAWA, 2002).

O elemento *cis* BPC1 (AGAAAR), presente 5 vezes no promotor *CaLTP3*, apresenta-se como um regulador transcricional presente em genes relacionados às vias de desenvolvimento, como a formação de carpelos e óvulos.

Em sementes, direcionam a formação do zigoto e endosperma (MEISTER et al., 2003; MONFARED et al., 2011). O núcleo TGAC do motivo W-box é a sequência de reconhecimento de fatores *trans* WRKY. Essas proteínas agem como repressoras transcricionais da via de sinalização da giberelina em genes responsivos à patogenicidade.

O motivo *cis* E2F (WTTSSCSS) é a sequência-alvo para proteínas *trans* ativadoras DP que se ligam ao DNA no sítio de reconhecimento E2 (TTTC[CG]CGC, 5'– 3'). Esse elemento, identificado na região promotora de inúmeros genes cujos produtos estão envolvidos na regulação do ciclo celular ou na replicação do DNA, apresentou 4 ocorrências ao longo do promotor *CaLTP3*. Este motivo regula a expressão positiva e negativamente, estimulando a proliferação e retardando a diferenciação celular (KOSUGI e OHASHI, 2002). Os maiores níveis de expressão do gene *CaLTP3* foram observados com 90 e 120 DAF, fase do desenvolvimento representada por rápida expansão do endosperma, evidenciando uma possível participação deste elemento *cis* na regulação do gene *CaLTP3*.

No presente trabalho foi identificada a presença de motivos *cis* específicos de semente ao longo de toda a região promotora do gene *CaLTP3*. Alta frequência de elementos *cis* semente-específicos foi observada na região do promotor de 451pb. Esse resultado é condizente com dados da literatura que identificam motivos que conferem especificidade de expressão em sementes na região proximal do promotor, frequentemente na região de 500 pares de bases a montante do sítio de início da transcrição (CHAMBERLAND et al., 1992; WU et al., 2000; CHANDRASEKHARAN et al., 2003). Entretanto, há grande frequência destes elementos *cis* também na porção *upstream* do fragmento promotor de 1253 pb, precisamente na região que contém os últimos 200pb. Esta última região apresentou alta frequência do motivo AACA, embora esse elemento sozinho pareça não exercer atividade endosperma específica, como



discutido anteriormente, a ação sinérgica com o motivo *cis* ACGT pode ser essencial para conferir a especificidade em semente (WASHIDA et al., 1999). Esse padrão de sinergia está presente apenas no fragmento promotor de 451 pb (Figura 26 D). Além disso, outros padrões *in tandem* ocorrem exclusivamente na região do promotor menor como a presença de cinco elementos GATAbbox, ACGT core, MYBHv1, CAAT e Skin-1 que podem atuar juntos na regulação da expressão semente-específica.

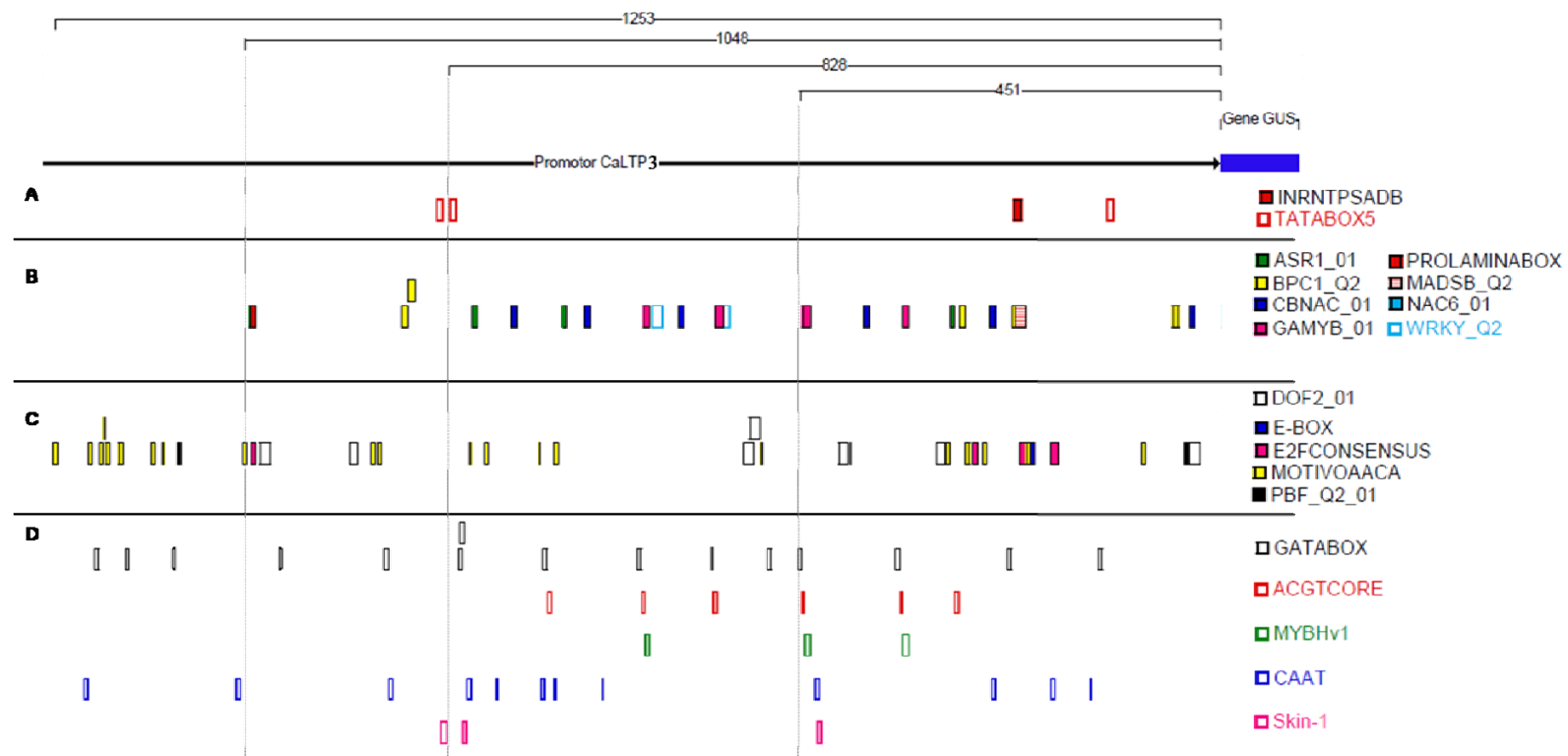


Figura 26 Sequência promotora consenso do gene *CaLTP3*. A ilustração permite identificar a localização e frequência dos motivos *cis* encontrados na sequência promotora do gene *CaLTP3* por meio de análise nos bancos PlantCare, PLACE e Transfac 6. Didaticamente, os elementos *cis* foram agrupados de acordo com descrições da literatura em (A) grupo de elementos basais, (B) grupo relacionado a expressão órgão-específica, (C) grupo endosperma-específicos e (D) grupo de elementos *in tandem*. As barras horizontais na parte superior da figura ilustram os fragmentos promotores utilizados para o ensaio de expressão em *Nicotiana tabacum*.

#### 4.5 Ensaio de expressão dos fragmentos promotores do gene *CaLTP3* em *Nicotiana tabacum*

Os fragmentos de 1253, 1048, 828 e 451 pb do promotor *CaLTP3* amplificados a partir do DNAg de *C. arabica* var Catuaí amarelo foram clonados em vetores binários e transformados via *Agrobacterium tumefaciens* na planta modelo *N. tabacum* para análises de expressão envolvendo o gene repórter *uidA* (Figura 27).



Figura 27 Plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* com os fragmentos promotores do gene *CaLTP3*. (A) Plântulas controle (não transformadas) em meio MS sem antibióticos (esquerda) e em meio de seleção MS com os antibióticos Canamicina [ $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] e Cefotaxima [ $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] (direita) (B) Dicos foliares de plantas transformadas com o fragmento promotor de 1048 pb do gene *CaLTP3*. O círculo destaca a regeneração de brotos transformados após seis semanas em meio de seleção. (C) Plantas jovens de *N. tabacum* que foram transferidas dos meios de seleção em tubos de ensaios para substrato vegetal. (D) Plantas de *N. tabacum* aclimatadas em casa de vegetação e cobertas com sacos durante o período reprodutivo para evitar o fluxo gênico entre as plantas transformadas. (E) Ensaio histoquímico das plantas transformadas e não transformadas.

O total de 71 plantas T<sub>0</sub> foram analisadas quanto a expressão do gene *uidA* por meio de testes histoquímicos (Tabela 6).

Tabela 6 Distribuição de plantas T<sub>0</sub> avaliadas no ensaio de expressão. As plantas não transformadas (NT) foram utilizadas como controle negativo dos experimentos.

Construção	Número de plantas analisadas
NT	8
pBI121	14
pCaLTP3_451	13
pCaLTP3_828	14
pCaLTP3_1048	8
pCaLTP3_1253	14

As análises histoquímicas de atividade GUS (codificada pelo gene *uidA*) foram realizadas em raízes, folhas, frutos, sementes, gineceu, pétalas e anteras de plantas T<sub>0</sub> de *N. tabacum* transformadas e não transformadas (controle negativo). Os resultados evidenciam que os fragmentos promotores-*CaLTP3* de 1253 pb, 1048 pb e 828 pb direcionam a expressão do gene *gus* para a todos os órgãos da planta, com exceção das raízes onde nenhum dos fragmentos promotores promove expressão do gene *uidA*. O fragmento menor, de 451 pb induziu a expressão do gene *gus* exclusivamente nas sementes. Como esperado, o promotor 35S foi capaz de regular a expressão de maneira constitutiva e forte em todos os tecidos analisados e o oposto aconteceu para os tecidos das plantas não transformadas, onde nenhuma atividade GUS foi detectada (Figura 28).

Estes resultados são condizentes com a validação e caracterização experimental do gene *CaLTP3* em endosperma de café e com as análises de elementos *cis* semente-específicos encontrados ao longo de toda a região promotora. Nas análises histoquímicas em plantas de *N. tabacum*, o fragmento de 451pb do promotor do gene *CaLTP3* confirmou a regulação semente-específica.

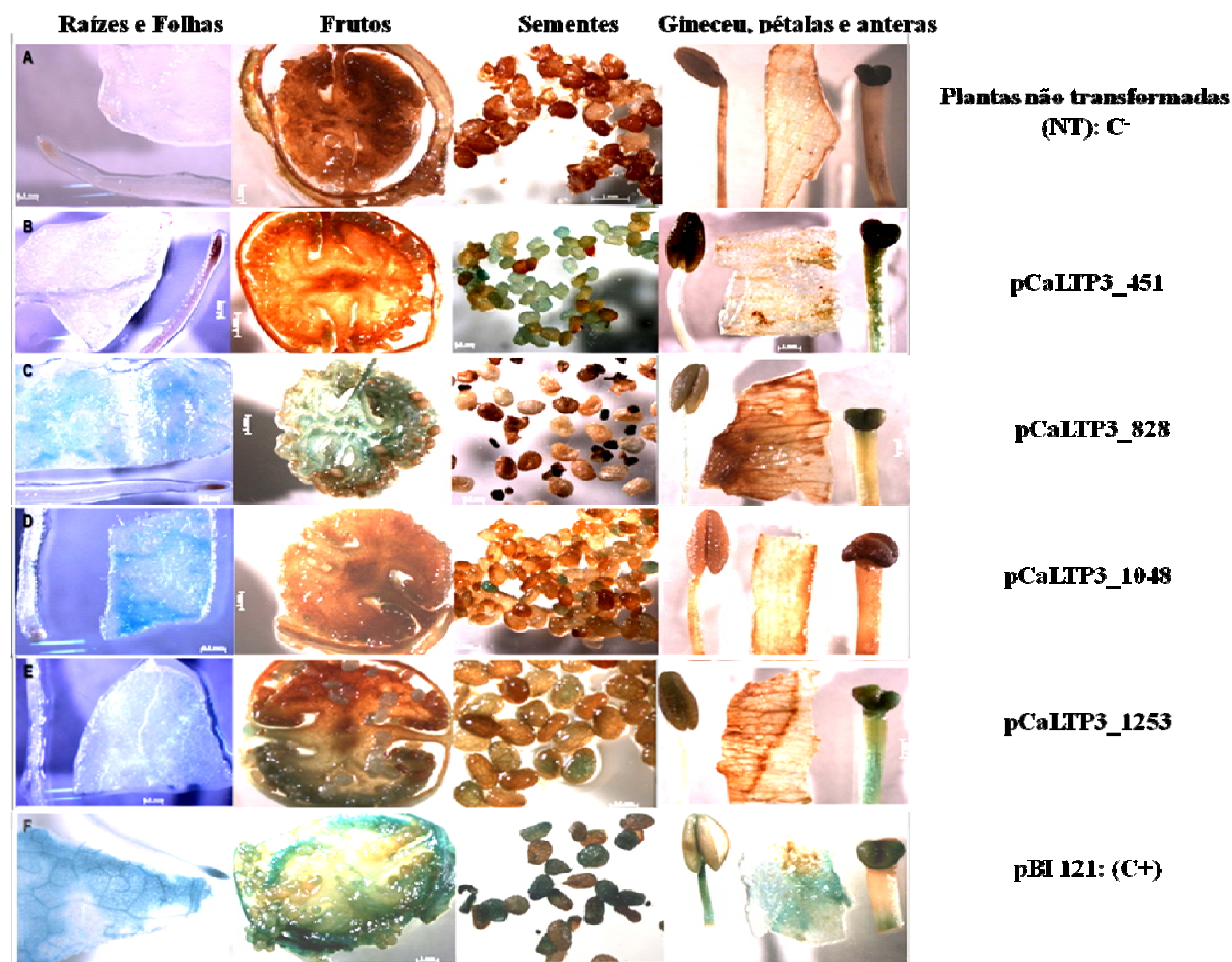


Figura 28 Fotomicrografia do ensaio histoquímico GUS em plantas de *N. tabacum* transformadas com vetores binários contendo diferentes fragmentos do promotor do gene *CaLTP3* de *C. arabica*. (A) Plantas não transgênicas (controle negativo). (B, C, D e E) Plantas transgênicas transformadas com diferentes fragmentos do promotor do gene *CaLTP3* (0,45, 0,82, 1,0 e 1,2 kb, respectivamente) a montante do gene repórter *uidA*. (F) Plantas transgênicas transformadas com o promotor 35S a montante do gene *uidA* (controle positivo). Da esquerda para a direita os tecidos examinados foram os seguintes: raízes e folhas, frutos, sementes, gineceu, pétalas e anteras.

Esses resultados indicam que o fragmento promotor menor concentra todos os elementos *cis* necessários para a maior expressão e especificidade em semente, o que corrobora com os resultados de análises *cis* para esta região. O controle da expressão gênica por regiões parciais do promotor foi evidenciado no trabalho de Marraccini e colaboradores (1999), no qual o fragmento de 259 pb entre a região -754 e -1013 foi responsável pela expressão semente-específica em tabaco do promotor 11S de café.

O promotor completo do gene *CaLTP3* regula a atividade específica em endosperma em *C. arabica* o que não acontece em *N. tabacum* com o promotor maior (1253 pb) avaliado neste trabalho. Isso pode ser explicado pelas complexas interações entre a região promotora e elementos distais presentes no genoma de cada uma das espécies (*C. arabica* e *N. tabacum*) que poderiam estar presentes no genoma de café, mas ausentes no genoma de tabaco. Além disso, em plantas, genes podem ser silenciados por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. O silenciamento pós-transcricional de genes, onde ocorre a manutenção da atividade transcricional do promotor, resulta da instabilidade dos transcritos gerados e da capacidade de degradação de RNAs homólogos (VAUCHERET et al, 2001).

Transformantes T<sub>0</sub> independentes regenerados de cada construção foram autofecundados e análises de segregação foram realizadas para caracterizar o número de cópias do gene *npt II* na geração T<sub>1</sub> (Tabela 7). As sementes obtidas foram analisadas quanto à resistência à canamicina por exame de frequência verificado pelo teste estatístico  $\chi^2$  para identificar as plantas com apenas uma única cópia do T-DNA integrado no genoma. Para isso, sementes de cada uma das 63 plantas T<sub>0</sub> transgênicas foram inoculadas no meio MS com canamicina e os dados foram analisados somente para amostras com pelo menos 90 plântulas T<sub>1</sub> germinadas (Tabela 7). As análises de  $\chi^2$  permitiram identificar os resultados significantes quanto ao modelo de segregação 3:1 do gene *npt II* (3 plantas

resistentes para 1 planta sensível), correlacionando às taxas teóricas e experimentais de acordo com a segregação Mendeliana para um gene dominante único. Os valores de  $\chi^2$  menores que 3,84 foram utilizados para a avaliação estatística o que determinou o grau de liberdade de 0.05.

Tabela 7 Segregação Mendeliana (3:1) do gene *npt II* em plantas de *N. tabacum* transgênicas da progênie T<sub>1</sub> transformadas com os promotores de 1253 pb, 1048 pb, 828 pb e 451 pb no vetor pBI 121. \*Plantas selecionadas para o ensaio fluorimétrico.

Identificação do transformante	Identificação da planta T <sub>0</sub>	Sementes germinadas	Km <sup>R</sup>	Km <sup>S</sup>	$\chi^2$
PCaLTP3_451	2	224	160	64	1,52
	3	158	110	48	2,44
	4	245	174	71	2,07
	6	291	218	73	0,001
	7*	90	69	21	0,133
	8	150	112	38	0,088
pCaLTP3_828	5*	101	84	17	2,702
	9	159	120	39	0,0187
	10	138	107	31	0,468
	11	146	118	28	3,12
pCaLTP3_1048	2	135	103	32	0,121
	3	104	81	23	0,47
	5	207	147	60	1,75
pCaLTP3_1253	1	212	167	45	1,6
	2	240	178	62	0,08
	4	217	154	63	1,88
	15	177	132	45	0,016
pBI121	4*	223	159	64	1,63
	9	102	81	21	1,05
	10	124	84	40	3.48

Na maioria dos casos, os genes transformados comportam-se como loci dominantes únicos, exibindo segregação Mendeliana normal, porém a segregação não-Mendeliana também tem sido estudada em plantas transgênicas (CHRISTOU et al., 1989). Foi relatado que inserções únicas do T-DNA resultam em altos níveis de expressão do transgene, enquanto múltiplas cópias levam a supressão dos genes quiméricos em alguns casos (VAN DER KROL, 1990).



Dentre as 63 plantas transgênicas  $T_0$ , 20 apresentaram segregação mendeliana 3:1 na progênie  $T_1$ . (Tabela 7).

Análises dos níveis de atividade GUS foram realizadas por meio de teste fluorimétrico em folhas de plantas  $T_0$  de *N. tabacum* transformadas com uma única cópia do T-DNA inserida no genoma. Foram selecionadas apenas folhas das plantas pCaLTP3\_451 (planta 7) e pCaLTP3\_828 (planta 5) que apresentaram, respectivamente, menor e maior expressão do gene *uidA* nos ensaios histoquímicos. Essas amostras apresentaram níveis de expressão baixo ou nulo para atividade GUS nos ensaios quantitativos, semelhante aos níveis apresentados para as plantas não transformadas (Figura 29).

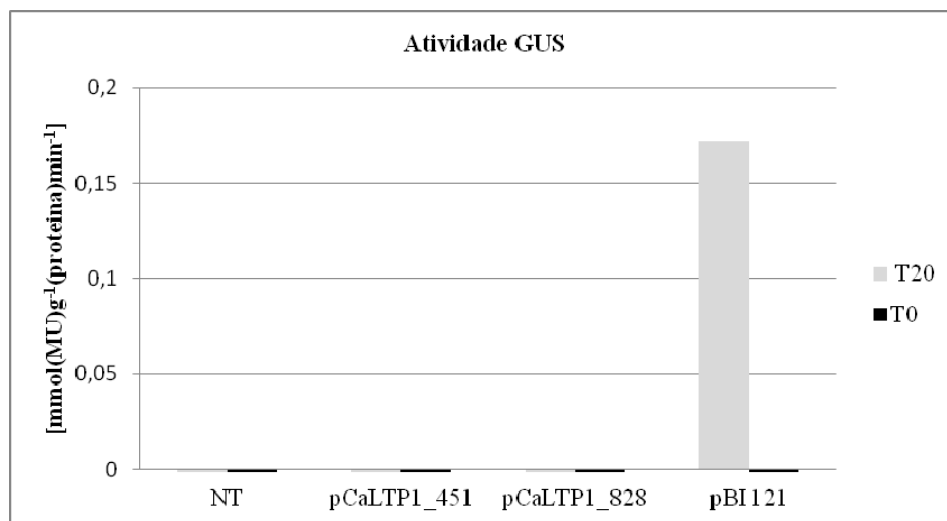


Figura 29 Controle de regulação dos fragmentos promotores de *CaLTP3* no nível de atividade GUS em folhas de *N. tabacum*. Os valores de atividade GUS para as plantas transformadas (pBI121 [planta 4], pCaLTP3\_451 [planta 7] e 828 [planta 5] e não transformadas (NT) [planta 4] analisadas foram obtidos pelo valor médio das triplicatas técnicas.  $T_{20}$  e  $T_0$  referem-se aos tempos de reação da enzima GUS e substrato MUG a 37 °C.

Tal resultado é condizente com a expressão semente-específica regulada pelo promotor *CaLTP3* e verificada nas análises anteriores, entretanto, é um dado preliminar. Experimentos adicionais serão conduzidos em um maior número de amostras em folhas e em sementes para verificar os níveis da atividade GUS conduzidos por cada um dos fragmentos promotores isolados neste trabalho. O protocolo para realização do ensaio fluorimétrico em placas foi recentemente adaptado pelo nosso laboratório, o que minimiza erros experimentais e aumenta a acurácia. Isto demandou mais tempo do que o esperado. Agora, pretende-se realizar as análises adicionais o quanto antes.

## 5 CONCLUSÕES

- O Banco de ESTs e as análises *in silico* mostraram-se adequadas para a busca de genes órgão-específicos;
- Genes homoeólogos de *CaLTP* característicos dos subgenomas *C. canephora* (*CaCc*) e *C. eugenioides* (*CaCe*) foram identificados no genoma de *C. arabica*;
- O gene *CaLTP* é expresso em frutos a 120 DAF e a isoforma de *CaCc*, é preferencialmente expressa em endosperma a 90 DAF;
- Genes ortólogos e homeólogos de *CaLTP* foram identificados e caracterizados como *nsLTPs* do tipo II e nenhum deles apresentou íntrons;
- O gene *CaLTP* demonstrou possuir regulação sob condições de déficit hídrico;
- A região promotora de 451 pb do gene *CaLTP3* regulou a tecido-especificidade do gene *uidA* em *N. tabacum*
- Houve ausência do direcionamento para expressão do gene *uidA* em folhas de *N. tabacum* pelos promotores de 451 pb e 828 pb.

## 6 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios Fluorimétricos adicionais em folhas e sementes com maior número de plantas;
- Analisar e comparar as sequências de genes, cDNAs e sequências promotoras com as sequências de DNAg de *C. canephora* que será publicada em breve;
- Executar novos ensaios expressão gênica em *C. arabica* por RT-qPCR com *primers* desenhados nas regiões conservadas dos genes homoeólogos (*CaCc* e *CaCe*);
- Conferir a expressão do gene *CaLTP* durante o ciclo de maturação dos frutos de *C. canephora*;
- Testar o promotor que representa o subgenoma de *C. eugenoides* em *N. tabacum* e posteriormente em *C. arabica*;
- Estudar a regulação dos fragmentos promotores do gene *CaLTP3* em outros sistemas heterólogos;
- Caracterizar a regulação destes promotores em plantas transgênicas de café;
- Publicar artigos com os resultados deste trabalho em revistas internacionais, uma vez que a patente do promotor do gene *CaLTP3* foi depositada no INPI.

## 7 ANEXO

Sequência do Contig 18885

```
ATCTGCAAAATATCATTCAACTTTCTCTATTGCGCTTTTGGCTTTTCATAAAG
ATGAAGAAATCATCTGGGGTTGCACTGTGCTGGTGCTTGGTTGTAAGTTGC
TGGTGGATCTGGGGCAAATCCGAGAGGCGGAGGCAGTCGGCTGCAATCCTC
AAGCATTGAGTCCATGCTTGCCTTCCATCATAAAAGACATTCCACCAACCCC
ACAATGCTGCACAAATGTCAAGGAACAGGAGCCCTGCCTTTGCAATTTTATC
AAAGATCCAGCATACGGCAACATTATAAAAAATCCCAATACCAAAAAAACT
CTTGAAGCCTGTGGTCTGAAATGGCCAACCTTGTCATAATCGACTGCTCCAT
TAAAGTTTATTTTCGGGCTAGTCAAATGTATTTTCTTTATATGCTCGAAACT
AGCAACGTTCCCATGTAATGGTGTTGAACGAGAAATAATATCAATAATATCT
ATGCGTCCCTTTTCCATTAAAAAAGGATTTATTAAACC
```

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABE, H. (2002). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscissic Acid Signaling. **The Plant Cell Online**, 15(1), 63-78.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; JULIAN LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2002) Control of gene expression. In: (Ed.). Molecular Biology of the Cell. 4. New York: Garland Science, p. 375-466.

ALBUQUERQUE, E.; CUNHA, W.; BARBOSA, A.; COSTA, P.; TEIXEIRA, J.; VIANNA, G.; CABRAL, G.; FERNANDEZ, D.; GROSSI-DE-AS, M. (2009). Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, 45:532-539.

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; ESPEOUT, S.; ROYER, M.; LECOULS, A. C.; NICOLE, M.; BERTRAND, B.; et al. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. **Plant Cell Reports**, 25(9), 959-67.

ALPIZAR, E.; DECHAMP E.; LAPEYRE-MONTES, F.; GUILHAUMON, C.; BERTRAND, B.; JOURDAN, C.; LASHERMES, P.; et al. (2008). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of Botany**, 101(7), 929-40.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, 215(3), 403-10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

AN, Y.-Q.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R. B. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **The Plant Journal**, 10(1), 107-121. doi:10.1046/j.1365-313X.1996.10010107.x

ANTHONY, F.; COMBES, C.; ASTORGA, C.; BERTRAND, B.; GRAZIOSI, G.; LASHERMES, P. (2002). The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Tag. Theoretical and Applied Genetics**, 104(5), 894-900. doi:10.1007/s00122-001-0798-8

ARONDEL, V.; TCHANG, F.; BAILLET, B.; VIGNOLS, F.; GRELLET, F.; DELSENY, M.; KADER, J. C.; et al. (1991). Multiple mRNA coding for phospholipid-transfer protein from *Zea mays* arise from alternative splicing. **Gene**, 99(1), 133-6.

ARONDEL, V.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; KADER, J. C. (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci.** 157:1-12.

ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; et al. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC. **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1389>; Acesso em: 20 de março de 2012.

ATKINSON, R. G.; BOLITHO, K. M.; WRIGHT, M. A.; ITURRIAGAGOITIA-BUENO, T.; REID, S. J.; ROSS, G. S. (1998). Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. **Plant Molecular Biology**, 38(3), 449-60.

BARBOSA, A. E.; ALBUQUERQUE, E.V.; SILVA, M. C.; SOUZA, D. S.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; VALENCIA, A.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. (2010). Alpha-amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha-amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology** 17, 10:44.

BARRO, F.; ROOKE, L.; BÉKÉS, F.; GRAS, P.; TATHAM, A. S.; FIDO, R.; LAZZERI, P. A.; et al. (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. **Nature Biotechnology**, 15(12), 1295-9.

BARROS, L. M. G. (1989). Transformação genética de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e Eletroporação. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília. Brasília, DF.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F.; SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. (2009). Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **Bmc Molecular Biology**, 10, 1. doi:10.1186/1471-2199-10-1

BATTRAW, M. J.; HALL, T. C. (1990). Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, 15(4), 527-38.

BENFEY, P. N.; REN, L.; CHUA, N. H. (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. **The Embo Journal**, 9(6), 1677-84.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. (2002). Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, 29(1), 23-32.

BERTRAND, B.; GUYOT, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P. (2003). Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. **Tag. Theoretical and Applied Genetics**, 107(3), 387-94. doi:10.1007/s00122-003-1203-6

BEVAN, M. W., FLAVELL, R.B e CHILTON, M.D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, 304, 184-187.



BORÉM, A. (1998). Melhoramento de Plantas. **In: A. Borém.** ed. 2, p. 453. Viçosa: ed. Universidade Federal de Viçosa.

BOUTROT, F.; GUIRAO, A.; ALARY, R.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. F. (2005) Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. **Biochim Biophys Acta, Gene Struct Exp.** 1730:114–125.

BOUTROT, F.; CHANTRET, N.; GAUTIER, M.-F. (2008). Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. **Bmc Genomics**, 9, 86. doi:10.1186/1471-2164-9-86

BOUTROT, F.; MEYNARD, D.; GUIDERDONI, E.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M.-F. (2007). The Triticum aestivum non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six TaLtp genes in transgenic rice. **Planta**, 225(4), 843-62.

BOWLING, S. A.; CLARKE, J. D.; LIU, Y.; KLESSIG, D. F.; DONG, X. (1997). The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. **The Plant Cell**, 9(9), 1573-84. doi:10.1105/tpc.9.9.1573

BOWLING, S. A.; GUO, A.; CAO, H.; GORDON, A. S.; KLESSIG, D. F.; DONG, X. (1994). A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, 6 (12), 1845-57.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-54.

BRANDALISE, M. (2007). Isolamento e caracterização de promotores tecido. **Tese de Doutorado** apresentada ao Instituto de Biociências, 141. Universidade Estadual de São Paulo - Unesp.

BRANDALISE, M.; SEVERINO, F. E.; MALUF, M. P.; MAIA, I. G. (2009). The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. **Plant Cell Reports**, 28(11), 1699-708.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (1998). Manual de transformação genética de plantas. **In: Manual de Transformação Genética de Plantas**. Eds. A. C. M. BRASILEIRO V. T. C. CARNEIRO, p. 309. Brasília: Embrapa.

BUSTIN, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal Mol. Endocrinol.**, 29, 23-39.

CAHOON, E. B.; SHANKLIN, J. (2000). Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, 97(22), 12350-5.

CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMART, L. B. (2006). Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, 140(1), 176-83.

CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K.; HENDRIKS, M.; EGGERMONT, K.; GODERIS, I. J.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; et al. (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiology**, 109(2), 445-55.

CANCHE-MOO, R. L. R.; KU-GONZALEZ, A.; BURGEFF, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; RODRÍGUEZ-ZAPATA, L. C.; CASTAÑO, E. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 84(3), 373-377. doi:10.1007/s11240-005-9036-4

CARVALHO, A. O.; MACHADO, O. L. T.; DA CUNHA, M.; SANTOS, I. S.; GOMES, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiol. Biochem.** 39: 137-146.

CARVALHO, C.H.S.; FAZUOLI, L.C.; CARVALHO, G.R.; GUERREIRO-FILHO, O.; PEREIRA, A.A.; DE ALMEIDA, S.R.; MATIELLO, J.B.; BARTHOLO, G.F.; SERA, T.; MOURA, W.M.; MENDES, A.M.G.; DE REZENDE, J.C.; DA FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; NACIF, A.P.; SILVAROLLA, M.B.; BRAGHINI, M.T. (2008). Cultivares de café arábica de porte baixo. **In Cultivares de Café: Origem, Características E Recomendações; Carvalho, C.H.S.** Ed. Embrapa Café, Brasília, Brazil, 157-226

CHAKALOVA, L.; FRASER, P. (2010). Organization of transcription. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2: a000729.

CHAMBERLAND, S.; DAIGLE, N.; BERNIER, F. (1992). The legumin boxes and the 3' part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, 19(6), 937-949.

CHANDRASEKHARAN, M. B.; BISHOP, K. J.; HALL, T. C. (2003). Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, 33(5), 853-66.

CHENG, H.-C.; CHENG, P.-T.; PENG, P.; LYU, P.-C.; SUN, Y.-J. (2004). Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. **Protein Science: A Publication of The Protein Society**, 13(9), 2304-15.

CHRISTOU, P.; SWAIN, W. F.; YANG, N. S.; MCCABE, D. E. (1989). Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, 86(19), 7500-4.

CHUNG, K.J.; HWANG, S.K.; HAHN, B. S.; KIM, K. H.; KIM, J. B.; KIM, Y. H.; YANG, J. S.; HA, S. H. (2008). Authentic seed-specific activity of the

*Perilla oleosin 19* gene promoter in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Rep** 27:29–37.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. (2009). Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, 28(1), 73-81.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. (2011). Flow cytometric analysis using SYBR Green I for genome size estimation in coffee. **Acta Histochemica**, 113(2), 221-5.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento Da Safra Brasileira: Café**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10\\_12\\_14\\_11\\_47\\_58\\_boletim\\_cafe\\_dezembro\\_2010.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_12_14_11_47_58_boletim_cafe_dezembro_2010.pdf)> Acesso em: 20 de Maio de 2012.

CRISOSTO, C. H.; GRANTZ, D. A.; MEINZER, F. C. (1992). Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree Physiology**, 10(2), 127-39.

CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L. M. G.; ROMANO, E.; et al. (2009). Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, 23(4), 607-616.

CUBRY, P.; MUSOLI, P.; LEGNATÉ, H.; POT, D.; DE BELLIS, F.; PONCET, V.; ANTHONY, F.; et al. (2008). Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome / National Research Council Canada**, 51(1), 50-63.

CUI, L.; WALL, P. K.; LEEBENS-MACK J. H.; LINDSAY, B. G.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J.; SOLTIS, P. S.; CARLSON, J. E.; ARUMUGANATHAN K.; BARAKAT, A.; ALBERT, V. A.; MA, H.; DEPAMPHILIS, C. W. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome research**, 16 738–749.

DAMON, A. (2000). A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research** 90(6):453-465.

DANIELL, H. (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nature Biotechnol.**, 20, 581-586.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of The Linnean Society**, 152(4), 465-512.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(1), 175-199.

DECAZY, F.; AVELINO, J.; GUYOT, B.; PERRIOT, J. J.; PINEDA, C.; CILAS, C. (2003). Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. **Journal of Food Science**, 68(7), 2356-2361.

DEIKMAN, J.; FISCHER, R. L. (1988). Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato. **The Embo Journal**, 7(11), 3315-20.

DEY, N.; MAITI, I. B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, 40(5), 771-82.

DHANKHER, O. P.; LI, Y.; ROSEN, B. P.; SHI, J.; SALT, D.; SENECOFF, J. F.; SASHTI, N. A.; et al. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, 20(11), 1140-5.

DIERYCK, W.; LULLIEN-PELLERIN, V.; MARION, D.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. F. (1995). Purification and activity of a wheat 9-kDa lipid

transfer protein expressed in *Escherichia coli* as a fusion with the maltose binding protein. **Prot. Exp. Purif.** 6, 597–603.

DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; NEVES-FERREIRA, A. G.; DA CUNHA, M.; ALVES, E. W.; OKOROKOVA-FACANHA, A. L.; OLIVEIRA, M. A.; PERALES, J.; MACHADO, O. L.; GOMES, V. M. (2006). Antimicrobial peptides from *chili pepper* seeds cause yeast plasma membrane permeabilization and inhibit the acidification of the medium by yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta**, 1760, 1323–1332.

DOULIEZ, J.-P.; MICHON, T.; ELMORJANI, K.; MARION, D. (2000). Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. **Journal of Cereal Science**, 32(1), 1-20.

DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, 19, 11-15.

EIRA, M.T.S.; WALTERS, C.; CALDAS, L.S.; FAZUOLI, L.C.; SAMPAIO, J.B.; DIAS, M.C.L.L. (1999). Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, 11(2), 97-105.

EKLUND, D. M.; EDQVIST, J. (2003). Localization of Nonspecific Lipid Transfer Proteins Correlate with Programmed Cell Death Responses during Endosperm Degradation in *Euphorbia lagascae* Seedlings. **Plant Physiology**, 132(3), 1249-1259.

ELMAYAN, T.; VAUCHERET, H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. **The Plant Journal**, 9(6), 787-797.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, 2(4), 953-71.

FAUTEUX, F.; STROMVIK, M. V. (2009) Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. **BMC Plant Biol** 9:126.

FAZUOLI, L.C. (1981). Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. **Colloque Intern.Sur La Protec. Des Cultur. Trop.**, Lyon, p.57.

FAZUOLI, L. C.; MEDINA-FILHO, H. P.; GUERREIRO-FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLA, M. B.; LIMA, M. M. A.; DE CARVALHO, A. (1999). **Cultivares de Café**. Campinas, Instituto Agrônômico.

FLEMING, A. J.; MANDEL, T.; HOFMANN, S.; STERK, P.; DE VRIES, S. C.; KUHLEMEIER, C. (1992). Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, 2(6), 855-62.

FOLSTAR, P. (1985). Lipids. **In R. Macrae (Ed.), Coffee Chemistry**. In: Vol.1 ed., pp. 203-222. London, New York.: Elsevier Applied Science.

FOSTER, G. D.; ROBINSON, S.W.; BLUNDELL, R. P.; ROBERTS, M.; HODGE, R.; DRAPER, J.; SCOTT, R. (1992) A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins is expressed specifically in the tapetum and developing microspores, **Plant Sci.** 84 (2), 187-192.

GALLAGHER, S.R. (1992). GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. **Academic Press**, San Diego, CA.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; GUERREIRO, S. M. C.; CAVALARI, A. A.; POT, D.; PEREIRA, L. F. P.; LEROY, T.; et al. (2006). Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, 57(12), 3243-58.

GILMARTIN, P. M.; SAROKIN, L.; MEMELINK, J.; CHUA, N. H. (1990). Molecular light switches for plant genes. **The Plant Cell**, 2(5), 369-78.

GOLDBERG, R. B.; BARKER, S. J.; PEREZ-GRAU, L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. **Cell**, 56(2), 149-60.

GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; SHIGEMOTO, N.; TOKI, S.; TAKAIWA, F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nature Biotechnology**, 17(3), 282-6.

GRATTAPAGLIA, D. (2004). Integrating genomics into Eucalyptus breeding. **Genetics and Molecular Research: Gmr**, 3(3), 369-79.

GREEN, J.; VAIN, P.; FEARNEHOUGH, M. T.; WORLAND, B.; SNAPE, J. W.; ATKINSON, H. J. (2002). Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60(4), 197-205.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. (2002). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion In Plant Biology**, 5(2), 122-7.

GROSBOIS, M.; GUERBETTE, F.; KADER, J. C. (1989). Changes in Level and Activity of Phospholipid Transfer Protein during Maturation and Germination of Maize Seeds. **Plant Physiology**, 90(4), 1560-4.

GUERREIRO FILHO, O. (2006). Coffee leaf miner resistance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(1), 109-117.

GUIVARC'H, A.; CAISSARD, J. C.; AZMI, A.; ELMAYAN, T.; CHRIQUI, D.; TEPFER, M. (1996) In situ detection of expression of the *gus* reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. **Transgenic Res.**, 5, 281-288.



GUPTA, P.; RAGHUVANSHI, S.; K TYAGI, A. (2001). Assessment of the Efficiency of Various Gene Promoters via Biolistics in Leaf and Regenerating Seed Callus of Millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli*. **Plant Biotechnology**, 18(4), 275-282. doi:10.5511/plantbiotechnology.18.275

HAN, G. W.; LEE, J. Y.; SONG, H. K.; CHANG, C.; MIN, K.; MOON, J.; SHIN, D. H.; et al. (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **Journal of Molecular Biology**, 308(2), 263-78.

HATANAKA, T.; CHOI, Y. E.; KUSANO, T.; SANO, H. (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, 19(2), 106-110.

HEREDIA, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochim. Biophys. Acta** 1620: 1-7.

HERRERA, J. C.; COMBES, M. C.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A.; LASHERMES, P. (2002). Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* x *C. canephora*). **Tag. Theoretical and Applied Genetics**, 104(4), 661-668.

HERRERA, JUAN C, COMBES, M. C.; CORTINA, H.; LASHERMES, P. (2004). Factors influencing gene introgression into the allotetraploid *Coffea arabica* L. from its diploid relatives. **Genome / National Research Council Canada**, 47(6), 1053-60.

HERRERA, JUAN CARLOS, D'HONT, A.; LASHERMES, P. (2007). Use of fluorescence in situ hybridization as a tool for introgression analysis and chromosome identification in coffee (*Coffea arabica* L.). **Genome / National Research Council Canada**, 50(7), 619-26. doi:10.1139/g07-034

HINNIGER, C.; CAILLET, V.; MICHOUX, F.; BEN AMOR, M.; TANKSLEY, S.; LIN, C.; MCCARTHY, J. (2006). Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea*

*canephora* (Robusta) grain development. **Annals of Botany**, 97(5), 755-65.  
doi:10.1093/aob/mcl032

HOH, F.; PONS, J. L.; GAUTIER, M. F.; DE LAMOTTE, F.; DUMAS, C. (2005). Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. **Acta crystallogr, D Biol Crystallogr**. 61:397–406.

HODGSON, J. (2000). Scientists avert new GMO crisis. **Nature Biotechnology**, 18(1), 13.

HOLLENBACH, B.; SCHREIBER, L.; HARTUNG, W.; DIETZ, K. J. (1997). Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. **Planta**, 203(1), 9-19.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L.; HIGGINS, R.; MCGAUGHEY, W. (1999). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the european corn borer. **Science** (New York, N.Y.), 284(5416), 965-7.

HULL, R.; COVEY, S. N.; DALE, P. (2000). Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. **Microbial Ecology In Health and Disease**, 12(1), 1-5.

IGNACIMUTHU, S.; PRAKASH, S. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of chickpea with alpha-amylase inhibitor gene for insect resistance. **Journal of biosciences** 2006, 31(3):339-345.

INTERNACIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO. **Trade Statistics**. Disponível em: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics); <http://www.ico.org/prices/po.htm> - Acesso em: 20 de março de 2012.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. (2005). The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, 436(7052), 793-800.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M. J.; KITAMURA K. (1996) Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean. **Entomol Exp Appl** 79(3):309-315.

JANG, C. S.; LEE, H. J.; CHANG, S. J.; SEO, Y. W. (2004). Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Science**, 167(5), 995-1001.

JANG, C. S.; JUNG, J. H.; YIM, W. C.; LEE, B-M.; SEO, Y. W.; KIM, W. (2007). Divergence of genes encoding non-specific lipid transfer proteins in the Poaceae family. **Mol Cells** 24:215–223.

JANG, C. S.; YIM, W. C.; MOON, J. C.; HUNG, J. H.; LEE, T. G.; LIM, S. D.; CHO, S. H.; LEE, K. K.; KIM, W.; SEO, Y. W.; LEE, B. M. (2008). Evolution of non-specific lipid transfer protein (nsLTP) genes in the Poaceae family: their duplication and diversity. **Mol. Genet. Genomics**. 279, 481-497.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, 6(13), 3901-7.

JEGOU, S.; DOULIEZ, J. P.; MOLLE, D.; BOIVIN, P.; MARION, D. (2000) Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. **J. Agric. Food Chem.**48:5023–5029.

JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A. L. (2006). Composition of plant cuticular waxes. In **Biology of the plant cuticle** (eds. M. Reider and C. Müller), 145–181. Blackwell, Oxford, UK.

JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.e WALTER, P. (2002). **Molecular Biology of The Cell**, ed. 4. New York: Garland Science.

JONES, J. D. G.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. (1985). High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. **Embo Journal**, 4, 2411-2418.

KADER, J. C. (1975). Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. **Biochimica et Biophysica Acta**, 380(1), 31-44.

KADER, J. C.; JULIENNE, M.; VERGNOLLE, C. (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, 139(2), 411-6.

KADER, J.-C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47, 627-654.

KADER, J.-C. (1997). Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. **Trends In Plant Science**, 2(2), 66-70.

KAISER, J. (2000). Toxicology: Panel Urges Further Study of Biotech Corn. **Science** (New York, N.Y.), 290(5498), 1867a. doi:10.1126/science.290.5498.1867a

KALIFA, Y.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; ZACCAI, M.; SCOLNIK, P. A.; BAR-ZVI, D. (2004). The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. **The Biochemical Journal**, 381(2), 373-8.

KALLA, R.; SHIMAMOTO, K.; POTTER, R.; NIELSEN, P. S.; LINNESTAD, C.; OLSEN, O. A. (1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, 6(6), 849-60.

KELLEY, L. A.; & STERNBERG, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, 4(3), 363-71.

KLÖTL, A.; HE, X.; POTRYKUS, I.; HOHN, T.; FÜTTERER, J. (2002). Tissue-specific silencing of a transgene in rice. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, 99(16), 10881-6.

KOCHKO, A. D.; AKAFFOU, S.; ANDRADE, A. C.; CAMPA, C.; CROUZILLAT, D.; GUYOT, R.; HAMON, P.; et al. (2010). Advances in *Coffea* Genomics. In: **J.-C. Kader M. Delseny Ed. Advances in Botanical Research**, Vol. 53, pp. 23-53. Elsevier Ltd.

KOLOVOS, P.; KNOCH, T. A.; GROSVELD, F. G.; COOK, P. R.; PAPANTONIS, A. (2012). Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. **Epigenet. Chromatin** 5:1.

KOSUGI, S.; OHASHI, Y. (2002). E2Ls, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(19), 16553-8.

KOVALCHUK, N.; SMITH, J.; BAZANOVA, N.; PYVOVARENKO, T.; SINGH, R.; SHIRLEY, N.; ISMAGUL, A.; JOHNSON, A.; MILLIGAN, A. S.; HRMOVA, M.; LANGRIDGE, P.; LOPATO, S. (2012). Characterization of the grain-specific lipid transfer protein TdPR61 from wheat, and its promoter activity in wheat, barley, and rice. **Journal of Experimental Botany**, 1-16

KRISTENSEN, A.; BRUNSTEDT, J.; NIELSEN, K.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J. (2000). Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. **Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology**, 155(1), 31-40.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, K. V.; SARALA ITTY, S.; INDU, E. P.; GIRIDHAR, P.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. (2006). Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. **Plant Cell Reports**, 25(3), 214-22. doi:10.1007/s00299-005-0045-x

KUMPATLA, S. P.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; IYER, L. M.; GUOFU, L.; HALL, T. C. (1998). Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. **Trends in Plant Science**, 3(3), 97-104.

LASHERMES, P, COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular General Genetics: MGG**, 261(2), 259-66.

LASHERMES, P, PACZEK, V.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; COUTURON, E.; CHARRIER, A. (2000a). Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. **The Journal of Heredity**, 91(1), 81-5.

LASHERMES, P.; ANDRZEJEWSKI, S.; BERTRAND, B.; COMBES, M. C.; DUSSERT, S.; GRAZIOSI, G.; TROUSLOT, P.; et al. (2000b). Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **TAG Theoretical and Applied Genetics**, 100(1), 139-146.

LASHERMES, PHILIPPE, ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. (2008). Genomics of Coffee One of the World's Largest Traded Commodities. **In P. H. Moore R. Ming, Ed. Vol. 1**, pp. 203-226. Springer New York.

LE, L.Q.; LORENZ, Y.; SCHEURER, S.; FÖTISCH, K.; ENRIQUE, E.; BARTRA, J.; BIEMELT, S.; VIETHS, S.; SONNEWALD, U. (2006). Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. **Plant Biotechnol. J.** 4:231–242.

LEROY, T.; HENRY, A.-M.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R.; DURIS, D.; PHILIPPE, R. (2000). Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry 1Ac gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, 19(4), 382-385.

LESSARD, P. A.; ALLEN, R. D.; FUJIWARA, T.; BEACHY, R. N. (1993). Upstream regulatory sequences from two beta-conglycinin genes. **Plant Molecular Biology**, 22(5), 873-85.

LI, Z; JAYASANKAR, S; GRAY, DJ. (2001). Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three

constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). **Plant Science.**, 160, 877-887.

LIN, C.; MUELLER, L. A, MC CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PÉTIARD, V.; TANKSLEY, S. D. (2005). Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Tag. Theoretical and Applied Genetics.**, 112(1), 114-30.

LINDORFF-LARSEN, K.; WINTHER, J. R. (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS Letters**, 488(3), 145-8.

LIU, W.; HUANG, D.; LIU, K.; HU, S.; YU, J.; GAO, G.; SONG, S. (2010). Discovery, identification and comparative analysis of non-specific lipid transfer protein (nsLtp) family in Solanaceae. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 8(4):229-237.

LORENZ, Y.; ENRIQUE, E.; LEQUYNH, L.; FOTISCH, K.; RETZEK, M.; BIEMELT, S.; SONNEWALD, U.; VIETHs, S.; SCHEURER, S. (2006) Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. **J. Allergy Clin. Immunol.** 118:711–718.

MAITI, I. B.; GOWDA, S.; KIERNAN, J.; GHOSH, S. K.; SHEPHERD, R. J. (1997). Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. **Transgenic Research**, 6(2), 143-56.

MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W. J.; TESSERAU, S.; et al. (2003). Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41(1), 17-25.

MARRACCINI, P.; DESHAYES, A.; PÉTIARD, V.; ROGERS, W. J. (1999). Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 37(4), 273-282.

MARRACCINI, P.; FREIRE, L. P.; ALVES, G. S. C.; VIEIRA, N. G.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; RAMOS, H. J. O.; et al. (2011). RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, 11(1), 85.

MAXFIELD, F.R.; MONDAL, M. (2006). Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. **Biochem. Soc. Trans.** 34: 335–339

MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, M. A. T.; GUERREIRO FILHO, O. (1998). Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantia** 57: 45-48.

MCELROY, D.; BLOWERS, A. D.; JENES, B.; WU, R. (1991). Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. **Molecular General Genetics: MGG**, 231(1), 150-60.

MEISTER, R. J.; WILLIAMS, L. A.; MONFARED, M. M.; GALLAGHER, T. L.; KRAFT, E. A.; NELSON, C. G.; GASSER, C. S. (2003). Definition and interactions of a positive regulatory element of the *Arabidopsis* INNER NO OUTER promoter. **The Plant Journal**, 37(3), 426-438.

MENG, F.; et al. (2004). Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (*Lepidoptera: noctuidae*). **Pest Manage Science**, v.60, p.167- 172.

MEYER, P.; SAEDLER, H. (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47, 23-48.

MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Lett.** 316: 119–122.



MOLINA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, 12(3), 669-75.

MONDEGO, J. M.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; TOKUDA, E. K.; PARIZZI, L. P.; COSTA, G. G.; PEREIRA, L. F.; et al. (2011). An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, 11(1), 30. BioMed Central Ltd.

MONFARED, M. M.; SIMON, M. K.; MEISTER, R. J.; ROIG-VILLANOVA, I.; KOOIKER, M.; COLOMBO, L.; FLETCHER, J. C.; et al. (2011). Overlapping and antagonistic activities of BASIC PENTACYSTEINE genes affect a range of developmental processes in Arabidopsis. **The Plant Journal**, 66(6), 1020-1031.

MONTGOMERY, J.; POLLARD, V.; DEIKMAN, J.; FISCHER, R. L. (1993). Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. **The Plant Cell**, 5(9).

MONTOYA, G.; VUONG, H.; BUELL, C. R.; CRISTANCHO, M.; MONCADA, P.; YEPES, M. (2006). Sequence analysis from leaves, flowers and fruits of *Coffea arabica* var Caturra. **21<sup>st</sup> International Conference on Coffee Science (ASIC)**. Montpellier, France.

MOORE, R. C.; PURUGGANAN, M. D. (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. **Curr Opin Plant Biol** 8: 122–128.

MOSHONOV, S.; ELFAKES, R.; GOLAN-MASHIACH, M.; SINVANI, H.; DIKSTEIN, R. (2008). Links between core promoter and basic gene features influence gene expression. **BMC Genomics**, 9, 92.

MOURRAIN, P.; BLOKLAND, R.; KOOTER, J. M.; VAUCHERET, H. (2007). A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. **Planta** 225:365–379.

MUELLER, L. A.; SOLOW, T. H.; TAYLOR, N.; SKWARECKI, B.; BUELS, R.; BINNS, J.; LIN, C.; et al. (2005). The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. **Plant Physiology**, 138(3), 1310-7. doi:10.1104/pp.105.060707

MURASHIGE, T e SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plant.**, 15, 473-497.

NETA-SHARIR, I.; ISAACSON, T.; LURIE, S.; WEISS, D. (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. **The Plant Cell**, 17(6), 1829-38.

NEUTEBOOM, L. W.; KUNIMITSU, W. Y.; WEBB, D.; CHRISTOPHER, D. A. (2002). Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, 163(5), 1021-1035.

NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; YE, X. (2012). Lipid-transfer proteins. **Biopolymers**, 98:268–279.

NICHOLASS, F. J.; SMITH, C. J. S.; SCHUCH, W.; BIRD, C. R.; GRIERSON, D. (1995). High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. **Plant Molecular Biology**, 28(3), 423-435. doi:10.1007/BF00020391

NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B. A. H.; FASOLINO, A.; HILBERS, C. W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. (2005). Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **The Plant Cell**, 17(7), 2009-19. doi:10.1105/tpc.105.032094

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, 313(6005), 810-812.

PARK, K.S e KLOEPPER, J. (2000). Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci. **Biol Control**, 18, 2-9.

PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F. J.; MOMEND, B.; WANG, C.; LEGER, R. S. (2008). Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, 99:220-226.

POETHIG, R. S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. **Science (New York, N.Y.)**, 250(4983), 923-30. doi:10.1126/science.250.4983.923

PONCET, V.; DUFOUR, M.; HAMON, P.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A.; LEROY, T. (2007). Development of genomic microsatellite markers in *Coffea canephora* and their transferability to other coffee species. **Genome / National Research Council Canada**, 50(12), 1156-61.

PONCET, V.; RONDEAU, M.; TRANCHANT, C.; CAYREL, A.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, P. (2006). SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular Genetics and Genomics**: MGG, 276(5), 436-49.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro Cell Devel Biol. Plant**. 40:1–22.

QU, L. Q.; TAKAIWA, F. (2004). Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. **Plant Biotechnol J**, 2(2):113–125.

RAMAKERS, C. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Lett.**, 339, 62-66.

REDDY, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. **Annu Rev Plant Biol.** 58:267-94.

REGENTE, M. C.; LA CANAL, L. D. (2000). Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiologia Plantarum**, 110 158–163.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. (2006). Production of herbicide-resistant coffee plants (*Coffea canephora* P.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49(1), 11-19.

RODRIGUES G.C., ROJAS J.S.D, ROUPSARD O., LEROY T., POT D., MOREIRA M.Z., VERDEIL J.L., DAUZAT J., JOURDAN C., ANDRADE A.C., MARRACCINI P (2010). Preliminary results on phenotypic plasticity of coffee (*Coffea arabica* Cv. Rubi and Iapar59) plants in response to water constraint under field conditions. **23rd International Conference on Coffee Science**, Bali-Indonesia, CD-rom, PB731.

RODRIGUES G.C., ROJAS J.S.D., ROUPSARD O., LEROY T., POT D., MOREIRA M.Z., VERDEIL J.L., DAUZAT J., JOURDAN C., ANDRADE A.C., MARRACCINI P. (2011). Resultados preliminares da plasticidade fenotípica em plantas de café (*Coffea arabica* cv. Rubi e IAPAR59) submetidas ao déficit hídrico em condições de campo. **VII Simpósio de Pesquisa Dos Cafés Do Brasil**, Araxá (MG)- Brazil, CD-rom 122.

ROSILLO, A. G. , ACUNA, J. R. , GAITAN, A. L. ; PENA, M. (2003). Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 74: 45-49.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods In Molecular Biology** (Clifton, N.J.), 132, 365-86.

RUSHTON, P.J., REINSTÄDLER, A.; LIPKA, V.; LIPPOK, B.; SOMSSICH, E.I. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements

provide novel insights into pathogen and wound induced signaling. **Plant Cell**, 14, 749-762.

SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; BARBER, D.; DIAZ-PERALES, A. (2007). Plant nonspecific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. **Biochim. Biophys. Acta**. 1771:781–791.

SALES, R. M. O. B e SILVA, F. R. (2005). Desenvolvimento de ferramenta web para análise de dados de projeto genoma do tipo EST. **In: Anais do Resumo - Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 10, pg. 61, Brasília, DF.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Ed. **Cold Spring Harbor**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.

SAMUEL, D.; LIU, Y.-J.; CHENG, C.-S.; LYU, P.-C. (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **The Journal of Biological Chemistry**, 277(38), 35267-73.

SANGER, M.; DAUBERT, S.; GOODMAN, R. M. (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. **Plant Molecular Biology**, 14(3), 433-443.

SATYANARAYANA, K. V.; KUMAR, V.; CHANDRASHEKAR, A.; RAVISHANKAR, G. A. (2005). Isolation of promoter for N-methyltransferase gene associated with caffeine biosynthesis in *Coffea canephora*. **Journal of Biotechnology**, 119(1), 20-5. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.06.008

SCHEID, O. M.; PROBST, A. V.; AFSAR, K.; PASZKOWSKI, J. (2002). Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, 99(21), 13659-13662.

SCHENK, P. M.; REMANS, T.; SÁGI, L.; ELLIOTT, A. R.; DIETZGEN, R. G.; SWENNEN, R.; EBERT, P. R.; et al. (2001). Promoters for pregenomic

RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. **Plant Molecular Biology**, 47(3), 399-412.

SCHROEDER, H. E.; GOLLASCH, S.; MOORE, A.; TABE, L. M.; CRAIG, S.; HARDIE, D. C.; CHRISPEELS, M. J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. V. (1995). Bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*bruchus pisorum*) in transgenic peas (*pisum sativum*). **Plant physiology** 107:1233-1239.

SCOTT, S. E; WILKINSON, M. J. (1999). Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. **Nature Biotechnol.**, 17, 390-392.

SEGURA, A.; MORENO, M.; GARCIA-OLMEDO, F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. **FEBS Lett.** 332: 243–246.

SENGUPTA-GOPALAN, C.; REICHERT, N. A, BARKER, R. F.; HALL, T. C.; KEMP, J. D. (1985). Developmentally regulated expression of the bean beta-phaseolin gene in tobacco seed. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, 82(10), 3320-4.

STERK, P.; BOOLJ, H.; SCHELLEKENS, G.A.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. **Plant Cell** 3, 907-921.

SHINTANI, D.; DELLAPENNA, D. (1998). Elevating the Vitamin E Content of Plants Through Metabolic Engineering. **Science**, 282(5396), 2098-2100.

SHOEMAKER, R.; KEIM, P.; VODKIN, L.; RETZEL, E.; CLIFTON, S. W.; WATERSTON, R.; SMOLLER, D. (2002). A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. **Genome / National Research Council Canada**, 45(2), 329-38.

SHU Q.; YE G.; CUI H.; CHENG X.; XIANG Y.; WU D.; GAO M.; XIA Y.; HU C.; SARDANA R.; ALTOSAAR I. (2000) Transgenic rice plants with a

synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. **Mol. Breed** 433–439.

SIMKIN, A. J.; QIAN, T. Z.; CAILLET, V.; MICHOUX, F.; BEN AMOR, M.; LIN, C. W.; TANKSLEY, S.; MCCARTHY, J. (2006). Oleosin gene family of *Coffea canephora*: quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. **Journal Plant Physiol**, 163, 691-708.

SKRIVER, K.; LEAH, R.; MÜLLER-URI, F.; OLSEN, F. L.; MUNDY, J. (1992). Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene *Ltp1*. **Plant Molecular Biology**, 18(3), 585-9.

SOLLETI, S. K.; BAKSHI, S.; PURKAYASTHA, J.; PANDA, S. K.; SAHOO, L. (2008). Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean alpha-amylase inhibitor 1 confer resistance to storage pests, bruchid beetles. **Plant Cell Rep** 27(12):1841-1850.

SONG, F e GOODMAN, R. M. (2002). Cloning and identification of the promoter of the tobacco *Sar8.2b* gene, a gene involved in systemic acquired resistance. **Gene**, 290,115-124.

SOSSOUNTZOV, L.; RUIZ-AVILA, L.; VIGNOLS, F.; JOLLIOT, A.; ARONDEL, V.; TCHANG, F.; GROSBOIS, M.; et al. (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. **The Plant Cell**, 3(9), 923-33.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. (2006). The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(1), 201-216.

STUIVER, M. H.; CUSTERS, J. H. (2001). Engineering disease resistance in plants. **Nature**, 411(6839), 865-8.

SUH, M.C.; SAMUELS, A.L.; JETTER, R.; KUNST, L.; POLLARD, M.; OHLROGGE, J.; BEISSON, F. (2005). Cuticular lipid composition, surface

structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. **Plant Physiol.** 139: 1649–1665.

SUNILKUMAR, G.; CONNELL, J. P.; SMITH, C. W.; REDDY, A. S.; RATHORE, K. S. (2002). Cotton alpha-globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. **Transgenic Research**, 11(4), 347-59.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. (2002). Genetically engineered foods: implications for food allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, 2(3), 249-52.

TCHANG, F.; THIS, P.; STIEFEL, V.; ARONDEL, V.; MORCH, M. D.; PAGES, M.; PUIGDOMENECH, P.; et al. (1988). Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino acid sequence in maize. Amino acid sequence homologies between plant phospholipid transfer proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 263(32), 16849-55.

TERRAS, F. R.; GODERIS, I. J.; VAN LEUVEN, F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P.; BROEKAERT, W. F. (1992). *In vitro* antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. **Plant Physiol.** 100: 1055–1058.

The ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 408, 796–815.

THOMA, S.; HECHT, U.; KIPPERS, A.; BOTELLA, J.; DE VRIES, S.; SOMERVILLE, C. (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 105(1), 35-45.

THOMAS, T. L. (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. **The Plant Cell**, 5(10), 1401-10.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through



sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22(22), 4673-80.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. **In: International Conference on Bioinformatics and Computational Biology**, 1, 2003, Ribeirão Preto. Disponível em: <[http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/ribeirao\\_preto\\_poster.pdf](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/ribeirao_preto_poster.pdf)>. Acesso em: 30 dec. 2010.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M.; SANTOS, C. M. R.; JUNIOR, M. T. S. (2006) The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. **In: Annual Meeting of The Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology**. 35, Águas de Lindóia. Disponível em <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/sbbq.pdf>> . Acesso em: 30 dec. 2010

TOMASSEN, M. M.; BARRETT, D. M.; VAN DER VALK, H. C.; WOLTERING, E. J. (2007). Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. **J. Exp. Bot.** 58, 1151-1160.

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.-J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. (2006). Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 86(2), 197-204.

VAN DER GEEST, A. H.; HALL, T. C. (1996). A 68 bp element of the beta-phaseolin promoter functions as a seed-specific enhancer. **Plant Molecular Biology**, 32(4), 579-88.

VAN DER GEEST, A. H.; HALL, T. C. (1997). The beta-phaseolin 5' matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. **Plant Molecular Biology**, 33(3), 553-7.

VAN DER KROL, A. R. (1990). Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. **The Plant Cell Online**, 2(4), 291-299.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 55: 85–97.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, 114(Pt 17), 3083-91.

VENTER, M. (2007). Synthetic promoters: genetic control through *cis* engineering. **Trends Plant Sci.** 12(3):118-24

VERDAGUER, B.; DE KOCHKO, A.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. (1996). Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. **Plant Molecular Biology**, 31(6), 1129-39.

VERDAGUER, B.; DE KOCHKO, A.; FUX, C. I.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. (1998). Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. **Plant Molecular Biology**, 37(6), 1055-67.

VIDAL, R. O.; MONDEGO, J. M. C.; POT, D.; AMBRÓSIO, A. B.; ANDRADE, A. C.; PEREIRA, L. F. P.; COLOMBO, C. A.; et al. (2010). A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, 154(3), 1053-66.

VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; MORAES, A. H. DE A.; METHA, Â.; OLIVEIRA, A. C. DE, LABATE, C. A.; et al. (2006). Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(1), 95-108.

VIGNOLS, F.; LUNG, G.; PAMMI, S.; TREMOUSAYGUE, D.; GRELLET, F.; KADER, J. C.; PUIGDOMENECH, P.; DELSENY, M. (1994). Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. **Gene** 142: 265–270.

WANG, N.-J.; LEE, C.-C.; CHENG, C.-S.; LO, W.-C.; YANG, Y.-F.; CHEN, M.-N.; LYU, P.-C. (2012). Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). **Bmc Genomics**, 13(Suppl 1), S9. BioMed Central Ltd.

WASHIDA, H.; WU, C. Y.; SUZUKI, A.; YAMANOUCHI, U.; AKIHAMA, T.; HARADA, K.; TAKAIWA, F. (1999). Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. **Plant Molecular Biology**, 40(1), 1-12.

WASS, M. N.; KELLEY, L. A.; & STERNBERG, M. J. E. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. **Nucleic Acids Research**, 38(Web Server issue), W469-73.

WHITE, A. J.; DUNN, M.A.; BROWN, K.; HUGHES, M.A. (1994). Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. **J. Exp. Bot.** 45, 1885-1892.

WU, C.-Y.; WASHIDA, H.; ONODERA, Y.; HARADA, K.; TAKAIWA, F. (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis -element requirements for endosperm-specific gene expression. **The Plant Journal**, 23(3), 415-421.

YANAGISAWA, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. **Trends In Plant Science**, 7(12), 555-60.

YAMADA, M. (1992) Lipid transfer proteins in plants and microorganisms, **Plant Cell Physiol.** 33, 1-6

YANG, X.; TUSKAN, G.; CHENG, M. (2006). Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. **Plant Physiol.** 142: 820–830.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTL, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. (2000). Engineering the Provitamin A (-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. **Science**, 287(5451), 303-305.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Science: A Publication of The Protein Society**, 17(2), 191-8. doi:10.1110/ps.073300108

YUBERO-SERRANO, E.-M.; MOYANO, E.; MEDINA-ESCOBAR, N.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J.-L. (2003). Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. **Journal of Experimental Botany**, 54(389), 1865-77.

ZAVALLO, D.; BILBAO, M.; ESTEBAN, H. H.; HEINZ, R. (2010) Isolation and functional characterization of two novel seed-specific promoters from sunflower (*Helianthus annuus L.*), **Plant Cell Reports**, 29, 239–248.

ZHANG, W.; MCELROY, D.; WU, R. (1991). Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. **The Plant Cell**, 3(11), 1155-65.

ZHAO, Y.; SHAO, S.; LI, X.; ZHAI, Y.; ZHANG, Q.; QIAN, D.; WANG, Q. (2012) . Isolation and activity analysis of a seed-abundant soyAP1 gene promoter from soybean. **Plant Mol Biol Rep.** 1-8.

ZHENG, Z.; MURAI, N. (1997). A distal promoter region of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, 128(1), 59-65. doi:10.1016/S0168-9452(97)00138-6

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO A. O.; DIAS G. B.; SILVA, N. C. M.; SANTOS, I. S.; NACIMENTO, V. V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L.T.; GOMES V. M.(2011). Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora*

seeds with  $\alpha$ -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta** 1810 375–383.